



Flávia Sofia Salgado de Freitas

Licenciada em Química Aplicada

**Identificação de marcadores de defeito
e monitorização da sua evolução ao
longo da vida útil de azeites virgens**

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em
Química Bioorgânica

Orientador: Professor Doutor Marco Diogo Richter Gomes da Silva



FACULDADE DE
CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA

Setembro 2017

Flávia Sofia Salgado de Freitas

Licenciada em Química Aplicada

**Identificação de marcadores de defeito
e monitorização da sua evolução ao
longo da vida útil de azeites virgens**

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em
Química Bioorgânica

Orientador: Professor Doutor Marco Diogo Richter Gomes da Silva

Setembro 2017

Identificação de marcadores de defeito e monitorização da sua evolução ao longo da vida útil de azeites virgens

Copyright © Flávia Sofia Salgado de Freitas, Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade Nova de Lisboa

A Faculdade de Ciências e Tecnologia e a Universidade Nova de Lisboa têm o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar esta dissertação através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, e de a divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objetivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.

Agradecimentos

Em primeiro lugar, gostaria de expressar os meus sinceros agradecimentos ao meu orientador, Professor Doutor Marco Gomes da Silva, pela confiança depositada quando me aceitou no seu grupo de investigação e entregou este projeto, pelo acompanhamento, apoio, desafios, conselhos, e por todos os momentos de ensino e disponibilidade demonstrada ao longo desta fase.

Aos colegas do Resolution Lab, principalmente ao Davide Mendes pela disponibilidade e paciência.

Aos meus amigos, uns dos meus apoios fundamentais ao longo desta caminhada, por terem estado sempre comigo, por toda a motivação, por ouvirem as minhas alegrias e frustrações, por me compreenderem e me darem uma razão para sorrir.

A toda a minha família, por compreenderem a minha ausência, por fazerem de tudo para me ver sorrir e me darem sempre motivos para continuar.

Ao meu irmão, por ser um dos meus melhores amigos, por todas as discussões acabadas em abraços e por muitas vezes remar o meu barco.

Aos meus pais, por serem os melhores pais do mundo, por me permitir esta oportunidade e outras aventuras, pelo apoio incondicional, pela confiança depositada em mim e nas minhas capacidades, e por nunca me deixarem falhar ou desistir de algo. Por me erguerem sempre, tudo isto só é possível graças a eles.

À empresa Victor Guedes pela disponibilidade e pelo financiamento deste projeto.

Resumo

O azeite é um dos produtos alimentares mais importantes na dieta mediterrânea. É muito apreciado pelos consumidores pelas suas propriedades organoléticas, qualidade nutricional, propriedades benéficas à saúde e elevado tempo de vida útil.

Com a empresa Victor Guedes, responsável pelo azeite Gallo, a 3ª maior marca de azeite mundial, estimou-se a durabilidade em armazém de um azeite já engarrafado para consumo.

Este trabalho teve como principais objetivos desenvolver estratégias analíticas que permitam estudar o perfil volátil de amostras de azeite: uma amostra de azeite monovarietal e uma amostra que constitui uma mistura de variedades de azeite. Correlacionando os dados cromatográficos com os obtidos por análise sensorial, foi estimada a durabilidade em prateleira das diferentes amostras por um período de 1 a 16 meses.

Neste trabalho foram estudados os compostos que atribuem atributos negativos, como a tulha, o ranço e o mofo, em dois tipos de amostras de azeite, variedade Arbequina e azeite Comunitário (mistura de variedades).

Recorreu-se à cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa, HS-SPME-GC/MS, para estudar o perfil volátil das amostras e identificar os compostos responsáveis pelos atributos negativos no azeite.

Foram identificados aproximadamente 400 compostos orgânicos voláteis de famílias funcionais muito variadas e utilizando análise de componente principal, PCA, resultaram 22 compostos que assinalam sensorialmente o aparecimento de defeito, correspondendo para a 1ª e 2ª componente principais, acima de 70% da variabilidade acumulada do sistema.

Nestes 22 compostos encontram-se álcoois, aldeídos e ácidos carboxílicos.

Palavras chave

Azeite, propriedades organoléticas, tulha, ranço, mofo, Arbequina, Comunitário, perfil volátil, PCA, SPME, GC/MS

Abstract

Olive oil is one of the most important food products in Mediterranean diet. It is appreciated by consumers for its organoleptic properties, nutritional quality, health benefits, and long shelf life.

With the support of the company Victor Guedes, responsible for Gallo olive oil, the third largest olive oil brand worldwide, we have estimated the durability in storage of bottled olive oil for consumption.

The main goals of this study was to develop analytical strategies to study the volatile profile of olive oil samples: one sample of monovarietal olive oil and one sample of a mixture of olive varieties.

Correlating the chromatographic data with the data from sensorial analysis, the shelf life of the different samples was estimated for a period of 1 to 16 months.

It was studied the compounds responsible for the negative attributes, such as fusty, rancid and mold, in two types of olive oil samples, Arbequina variety and Comunitário olive oil (mix of varieties).

The technique used to study the chromatographic profile and the responsible compounds for the negative defects in olive oil was gas chromatography coupled to mass spectrometry technique, HS-SPME-GC/MS.

Approximately 400 volatile organic compounds from very different functional families were identified, and using Principal Component Analysis (PCA) we obtained 22 compounds with sensory results for the defect appearance, corresponding to the first and second main components, above 70% of the accumulated variability of the system.

Key words

Olive oil, organoleptic properties, fusty, rancid, mold, Arbequina, Comunitário, chromatographic profile, PCA, HS-SPME-GC/MS

Índice

Agradecimentos.....	iii
Resumo.....	v
Capítulo 1. Introdução.....	1
1. O Azeite	3
1.1. História.....	3
1.2. A Dieta Mediterrânica e Benefícios do azeite na saúde	3
1.3. O azeite em Portugal	4
1.3.1. Variedades existentes em Portugal.....	5
1.3.2. Denominações de Azeite	6
1.4. Classificação do Azeite	9
1.5. Composição química do azeite.....	10
1.5.1. Fração Maioritária – Saponificável	10
1.5.2. Fração Minoritária – Insaponificável	12
1.6. Produção do Azeite	15
1.7. Seleção e Qualidade	17
1.8. Classificação Físico-Química.....	17
1.9. Classificação Organolética.....	18
1.9.1. Atributos positivos	19
1.9.2. Atributos negativos	19
1.10. Fatores de deterioração.....	21
1.11. Aroma, Sabor e Gosto	22
Capítulo 2. Parte Experimental	27
2.1. Amostras.....	29
2.2. Classificação Físico-Química e Organolética.....	29
2.3. Extração e Análise das Amostras	30
Capítulo 3. Resultados e Discussão.....	32
3.1. Classificação Organolética – Painel Sensorial	34
3.2. Perfil Cromatográfico.....	34
3.3. Identificação dos compostos nas amostras em estudo.....	38
3.4. Análise por Componente Principal.....	39
3.5. Identificação dos compostos indicadores de defeito	44
3.5.1. Aldeídos	45
3.5.2. Álcoois	49
3.5.3. Ácidos Carboxílicos	52
Capítulo 4. Conclusões e Perspetivas Futuras.....	54
Capítulo 5. Referências Bibliográficas.....	58

Índice de Figuras

Figura 1. Biossíntese do triglicérido.	11
Figura 2. Estrutura química dos álcoois fenólicos e seu derivado mais comum no azeite.	13
Figura 3. Estrutura química dos ácidos fenólicos.	13
Figura 4. Estrutura química das flavonas.	14
Figura 5. Esquema da produção do azeite.	15
Figura 6. Esquema de produção do azeite.	16
Figura 7. Esquema do mecanismo da oxidação enzimática dos ácidos linolénico e linoleico adaptado.	22
Figura 8. Esquema do sistema olfativo.	23
Figura 9. Principais vias envolvidas na formação do perfil volátil do aroma do azeite.	24
Figura 10. Evolução do logótipo Gallo.	25
Figura 11. Cromatogramas das amostras dopadas com manifesto defeito negativo de tulha, ranço e mofo.	35
Figura 12. Cromatogramas das amostras no início e no mês em que o defeito foi detetado pelo painel sensorial da VG para a amostra Comunitário, Comunitário com defeito mofo, tulha e ranço.	36
Figura 13. Cromatogramas das amostras no início e no mês em que o defeito foi detetado pelo painel sensorial da VG para a variedade Arbequina, Arbequina com defeito mofo, tulha e ranço.	37
Figura 14. PCA obtidas para as 4 amostras de Comunitário e respetivos defeitos aditivados com a indicação do mês em que o defeito foi encontrado por consenso.	40
Figura 15. PCA obtidas para as 4 amostras de Arbequina e respetivos defeitos aditivados com a indicação do mês em que o defeito foi encontrado por consenso.	42
Figura 16. Cromatograma da série homóloga de hidrocarbonetos.	46
Figura 17. Monitorização dos aldeídos através da extração de ião.	47
Figura 18. Amplificação do tempo de retenção de 7,5 minutos a 25 minutos para a monitorização dos aldeídos.	47
Figura 19. Monitorização dos aldeídos na posição 2 através da extração de ião.	48
Figura 20. Comparação do espectro de massa do hexanal com o da biblioteca NIST.	48
Figura 21. Monitorização dos álcoois através da extração de ião.	50
Figura 22. Monitorização de álcoois através da extração de ião.	50
Figura 23. Monitorizaçãoo de álcoois através da extração de ião.	50
Figura 24. Comparação do espectro de massa do hexanol com o da biblioteca NIST.	51
Figura 25. Monitorização dos ácidos carboxílicos através da extração de ião.	52
Figura 26. Monitorização dos ácidos carboxílicos através da extração de ião.	52
Figura 27. Comparação do espectro de massa do ácido acético com o da biblioteca NIST.	53

Índice de Tabelas

Tabela 1. Produção de azeite em Portugal. *Valores provisórios **Valores estimativos.....	5
Tabela 2. Percentagem de triglicéridos no azeite adaptado.....	11
Tabela 3. Composição lipídica do azeite adaptado	11
Tabela 4. Percentagem de ácidos gordos no azeite	12
Tabela 5. Amostras analisadas com indicação do mês em que o defeito foi detetado pelo painel sensorial da VG (encarnado) e do mês em que parte do painel indicou a presença do defeito mas sem unanimidade (laranja)	34
Tabela 6. Compostos que assinalam o aparecimento do defeito	44
Tabela 7. Perceção olfativa dos compostos que assinalam o aparecimento de defeito	45
Tabela 8. Monitorização dos aldeídos, tempo de retenção, relação massa/carga e índices de retenção lineares	49
Tabela 9. Monitorização dos álcoois, tempo de retenção, relação massa/carga e índices de retenção lineares	51
Tabela 10. Monitorização dos ácidos carboxílicos, tempo de retenção, relação massa/carga e índices de retenção lineares.....	53

Lista de Abreviaturas

%	Percentagem
°C	Graus celsius
a.C	Antes de Cristo
AAT	Acil transferases do álcool
Ác.	Ácido
ADH	Desidrogenases do álcool
AICEP	Agência para o Investimento e Comércio Externo de Portugal
AR	Azeite Arbequina sem presença de defeito
ARM	Azeite Arbequina dopado com o defeito mofo
ARR	Azeite Arbequina dopado com o defeito ranço
ART	Azeite Arbequina dopado com o defeito tulha
CEE	Comunidade Económica Europeia
cm	Centímetro
CO	Azeite Comunitário sem presença de defeito
COI	Conselho Oleícola Internacional
COM	Azeite Comunitário dopado com o defeito mofo
COR	Azeite Comunitário dopado com o defeito ranço
COT	Azeite Comunitário dopado com o defeito tulha
Da	Dalton
DOP	Denominação de Origem Protegida
DVB-Carb-PDMS	Revestimento de Divinilbenzeno/Carboxeno/Polidimetilsiloxano
et al.	E outros autores
eV	Eletrão volt
g	Gramma
GC	“ <i>Gas Chromatography</i> ” – Cromatografia gás-líquido

GC-MS	“ <i>Gas Chromatography – Mass Spectrometry</i> ” – Cromatografia gás líquido – Espectometria de massa
HS-SPME	“ <i>Headspace-Solid phase microextraction</i> ” – Microextração em fase sólida
kg	Kilograma
LRI	“ <i>Linear Retention Time</i> ” – Índice de retenção linear
m	Metro
M ⁺	Ião molecular
meq	Miliequivalentes
mg	Miligrama
min	Minuto
mm	Milímetro
MS	“ <i>Mass Spectrometry</i> ” – Espectrometria de massa
m/z	Razão massa/carga
nº	Número
NIST	“ <i>National Institute for Standard Technology</i> ”
nm	Nanómetros
PCA	“ <i>Principal Component Analysis</i> ” – Análise por Componente Principal
PC1	1ª Componente Principal
PC2	2ª Componente Principal
T	Temperatura
SPME	“ <i>Solid Phase Microextraction</i> ” – Microextração em fase sólida
UE	União Europeia
µg	Micrograma
UV	Ultra violeta
VG	Victor Guedes
ZB-5	Fase ligada apolar de 5% fenil, 95% polidimetilsiloxano
ZB-WAX	Fase ligada polar de polietilenoglicol

Capítulo 1. Introdução

1. O Azeite

No reino vegetal, muitos são os frutos e sementes que fornecem óleos comestíveis. No entanto, é o azeite, o mais importante e o mais utilizado na dieta mediterrânica [1].

O azeite, proveniente unicamente do fruto da oliveira, *Olea europaea* Linnaeus, é um alimento antigo, clássico da culinária contemporânea, omnipresente na dieta mediterrânica e utilizado cada vez mais em outras cozinhas [2]. Sendo o mais aromático dos óleos vegetais o azeite confere à comida um sabor único e aroma muito peculiar, pelas suas características químicas, biológicas e organoléticas, fazendo com que seja um produto insubstituível e muito apreciado.

Considera-se que o seu valor nutritivo é duplo dos cereais e dez vezes maior que o do vinho [3].

1.1. História

Possivelmente a oliveira, *Olea europaea* L., pertencente à família das *Oleaceae* e, foi a primeira planta de porte arbóreo a ser cultivada [3].

Contudo a sua origem não é consensual, mas segundo o Conselho Oleícola Internacional (COI) terá sido no 12º Milénio que esta apareceu na forma primitiva na região desde o sul do Cáucaso ao Irão, abrangendo a Palestina e as zonas costeiras da Síria. Estendendo-se até ao Chipre, e através de Creta chegou ao Egipto. Mais tarde, no início do século VI a.C., esta cultura chega à Tunísia e à ilha da Sicília, de onde foi levada para o sul de Itália. Assim, a olivicultura, durante o domínio romano, espalhou-se para o norte, chegando às zonas costeiras da bacia mediterrânica [3-4].

Com excelentes condições edafoclimáticas para a olivicultura, Portugal desde cedo dedicou-se à plantação da Oliveira. E ao longo do período medieval os olivais ocupavam os arredores das povoações e nos cursos de água próximos encontravam-se os lagares onde se extraía o azeite. Ainda hoje, existe um adensamento da área de olival em redor das povoações [3].

Mais tarde, na época dos descobrimentos e da colonização, foram Portugal e Espanha que exportaram a cultura da oliveira por todas as zonas do globo onde fosse possível a sua produção, uma vez que era economicamente tão importante nos seus países [5-6].

1.2. A Dieta Mediterrânica e Benefícios do Azeite na Saúde

A palavra dieta deriva do termo grego “*diaita*” que significa estilo de vida equilibrado. E a dieta mediterrânica é isso mesmo, um estilo de entender a vida e uma forma natural de comer, é caracterizada pela abundância em fruta, vegetais, cereais e legumes, e onde a principal fonte de

gordura é o azeite, tornando-se por isso uma dieta rica em ácidos gordos monoinsaturados e baixa em ácidos gordos saturados, contribuindo beneficemente para a saúde do ser humano [7-9].

Ao longo dos anos tem-se dado ênfase à Dieta Mediterrânica, porque apesar do elevado consumo de gordura, os estudos científicos evidenciam que este padrão alimentar está associado à diminuição de doenças cardiovasculares, cancro, diabetes, declínio cognitivo, aumento da qualidade de vida e longevidade, entre outros [10].

Sendo o azeite a principal fonte de gordura é importante estudar a sua composição. As gorduras são muito mais do que apenas fontes de energia, têm funções estruturais, de armazenamento e metabólicas [11].

O azeite é a prova de que é muito mais importante saber que tipo de gordura estamos a consumir em vez de querer saber que quantidade estamos a ingerir. Tal como outras gorduras vegetais, como os óleos de girassol e soja, o azeite contém na sua composição ácidos gordos. No entanto, ao contrário, destes óleos, o azeite não necessita de ser refinado antes do consumo, o que leva a que não haja alteração na sua composição original. Pois enquanto ácidos gordos saturados e ácidos gordos *trans* aumentam o risco de doenças cardiovasculares, os ácidos gordos insaturados diminuem [8, 12-13].

O azeite é obtido diretamente das azeitonas por processos mecânicos / físicos que não alteram a sua composição, é rico em ácido oleico e em outros compostos com grandes características benéficas para a saúde como por exemplo, a vitamina E, fitosteróis, carotenoides e compostos fenólicos [5, 11, 14].

Pode ser usado em todas as formas de confeção culinária, uma vez que suporta temperaturas muito elevadas, até cerca de 220°C, sem degradação dos seus componentes, não havendo formação de compostos nocivos à saúde, nomeadamente os ácidos gordos *trans* [15].

1.3. O azeite em Portugal

A produção de azeite é limitada por questões edafoclimáticas, o que faz com que 95% do território oleícola mundial esteja concentrado na Bacia Mediterrânica: Países produtores da União Europeia como Espanha, Itália, França, Grécia, Portugal, Chipre, Croácia, Eslovénia e Malta, são responsáveis por 71% da produção mundial. Países como a Tunísia, a Turquia, a Síria, a Argélia e Marrocos são responsáveis por cerca de 22% [4,16].

Ao longo dos últimos 10 anos, a produção mundial acusa uma taxa de crescimento média de 0,002%. E a nível da União Europeia, a produção tem crescido significativamente, sendo que Espanha ocupa atualmente o 1º lugar no ranking mundial dos países produtores [4].

Em Portugal, a área de Olival foi evoluindo ao longo dos anos, estando distribuído por todo o território nacional, exceto em certas zonas costeiras ou zonas de maior altitude. Contudo, a partir

da década de 60 até aos finais da década de 80, o desenvolvimento industrial e o êxodo rural levaram à diminuição da mão-de-obra da olivicultura, provocando um declínio progressivo na produção oleícola, passando de 90 000 toneladas a cerca de 35 000 toneladas [4]. No entanto, nos últimos anos tem-se verificado uma certa recuperação da produção, como indicado na Tabela 1.

Campanha	Produção (10 ³ toneladas)
07/08	36
08/09	53
09/10	63
10/11	63
11/12	76
12/13	59
13/14	92
14/15	61
15/16*	109
16/17**	94
Média	71

Tabela 1. Produção de azeite em Portugal. *Valores provisórios **Valores estimativos [4].

1.3.1. Variedades existentes em Portugal [11, 16-17]

Em Portugal existem cerca de 30 variedades de oliveira nativas, cada uma adaptada ao clima de determinada região do país, entre estas destacam-se as variedades Cobrançosa, Cordovil, Galega e Verdeal [11]. A maioria com grande produtividade e cada uma com características próprias como o rendimento, alternância, aptidão e características organolépticas. A variedade Verdeal resulta num azeite muito frutado, verde, amargo e picante, já a variedade Galega dá lugar a um azeite maduro e doce e as variedades Cobrançosa e Cordovil originam azeites com perfis intermédios [11].

Cobrançosa, de origem transmontana, com alta produtividade e produções regulares, vocacionada para a produção de azeite, com bom rendimento e de mediana riqueza em ácido linoleico. Pouco atreita a doenças na folhagem e acidentes climáticos. Origina um azeite equilibrado, medianamente frutado, subtilmente amargo e picante quando as azeitonas são colhidas mais verdes. Contudo, quando são colhidas mais maduras, o azeite torna-se mais doce e suave. Realça-se um sabor a erva verde, maçã verde e amêndoa.

Cordovil, variedade alentejana com produtividade alta e produção alternada, utilizada tanto na produção de azeite como na produção de azeitona de mesa. Um quanto suscetível ao ataque de tuberculose, à gafa e à mosca. O seu azeite é muito frutado com acentuado verde folha e medianamente amargo e picante.

Galega, é o cultivo mais difundido no país representando cerca de 80% do olival português e está presente nas Beiras, Alentejo e Algarve. Com produtividade alta e produção alternante, apresenta fraco ou médio rendimento em azeite pobre em ácido linoleico. É atreita a pragas e doenças. Origina um azeite suave e doce, com ligeiro frutado e notas suaves de verde folha, maçã madura e frutos secos, é pouco amargo e picante.

Verdeal, proveniente principalmente do Alentejo e de Trás-os-Montes, possui alta produtividade e produções regulares, originando um azeite com rendimento médio-alto. O seu azeite é persistentemente frutado, com verde folha e sabor bastante amargo e picante.

Outra variedade muito utilizada nas novas plantações de olival é a **Arbequina**, proveniente de Arbeca na Catalunha. Por ser uma variedade rústica, resistente a geadas e adaptável a diferentes climas e solos, e possuir uma copa reduzida, permite grandes densidades de plantação. É uma variedade muito produtiva e precoce, considerada auto fértil, apresenta elevado rendimento em azeite de boa qualidade, mesmo apresentando baixa estabilidade. Origina um azeite de carácter frutado e fresco, contendo notas de alcachofra e tomate, com sabor mais verde e picante quando as azeitonas são colhidas verdes, e mais doce quando são colhidas mais maduras.

1.3.2. Denominações de Azeite [16-18]

Em Portugal são vários os produtores de azeite que procuram garantir um produto de qualidade e referência com características únicas e específicas, elevando este produto tão típico a um produto de excelência e de enorme referência tanto a nível do mercado nacional como a nível internacional.

- **Denominação de Origem Protegida – DOP**

O azeite é um dos produtos mais importante do ponto de vista económico, paisagístico e social, e a criação da Denominação de Origem Protegida para os azeites de algumas regiões constituem uma evolução positiva para o mercado oleícola.

A Denominação de Origem Protegida (DOP) é a designação regulamentada pela União Europeia (UE) que protege os nomes de produtos ligados às cozinhas regionais. Assim os

produtos produzidos, elaborados e transformados numa determinada região, que têm um saber-fazer devidamente reconhecido e verificado ficam protegidos, garantindo ao consumidor que o produto foi obtido de forma tradicional e tem um sabor e aroma diferenciados.

Existem vários produtores de azeite em diferentes regiões do país que possuem a designação DOP.

Azeite de Moura

O azeite de Moura é um azeite peculiar, produzido pela combinação das principais variedades de azeitonas tradicionais das localidades de Moura e de Serpa no distrito de Beja, e de Mourão no distrito de Évora. É um azeite virgem e virgem extra composto pelas variedades de azeitona Cordovil (entre 35 a 40%), Verdeal (entre 15 a 20%) e Galega (restante). Possui acidez baixa a muito baixa, com uma cor amarela esverdeada, e um aroma e sabor frutado, amargo e picante nos primeiros meses a seguir à extração. São as variedades Galega e Verdeal que lhe conferem o aroma e sabor que lhe são próprios.

Azeite de Trás-os-Montes

O azeite de Trás-os-Montes é um azeite virgem e virgem extra produzido pelas variedades de azeitona Verdeal transmontana, Madural, Cobrançosa e Cordovil. É um azeite com acidez baixa a muito baixa, possui uma cor amarela esverdeada e tem um aroma e sabor a fruto fresco, por vezes amendoado com uma sensação de doce, verde, amargo e picante.

Azeite da Beira Interior

Azeite virgem e virgem extra proveniente da Beira Baixa e Beira Alta, produzido a partir das variedades de azeitona Galega, Verdeal, Cobrançosa e Cordovil. A variedade Galega usada maioritariamente neste azeite confere-lhe uma tonalidade amarela esverdeada a amarela levemente esverdeada, um aroma característico e um sabor frutado. É um azeite de baixa a muito baixa acidez.

Azeite do Alentejo Interior

Azeite virgem e virgem extra, de acidez baixa a muito baixa, que apresenta uma cor amarela dourada ou esverdeada, que combina diferentes sabores e aromas, como um suave frutado de azeitona, maçã e/ou figo e ainda uma típica sensação de doce. É produzido maioritariamente a partir das variedades Galega Vulgar (60%), Cordovil de Serpa e/ou Cobrançosa (40%), são ainda toleradas outras variedades (máximo 5%), com exceção das variedades Picual e Maçanilha.

Norte Alentejano

Azeite virgem e virgem extra ligeiramente espesso, frutado, com cor amarelo ouro por vezes ligeiramente esverdeada, muito agradável ao paladar, e com um perfume e gosto suave característico, que resultam da combinação das variedades de azeitona Galega (>65%), sendo toleradas as variedades Azeiteira, Blanqueta, Redondil e Carrasquenha (<5%), e Cobrançosa (<10%).

Azeite do Ribatejo

Proveniente do Ribatejo, este azeite virgem e virgem extra é obtido a partir das variedades de azeitona Galega e Lentisca. É de baixa a muito baixa acidez, ligeiramente espesso e frutado, possui uma cor amarelo ouro, às vezes ligeiramente esverdeado.

- **Azeite Biológico**

A União Europeia estabelece uma série de regras de produção e transformação para a Agricultura Biológica. Para a produção de azeite biológico, os olivais têm de ser orientados respeitando regras fixadas, sendo muito condicionado ou totalmente proibido o uso de fertilizantes ou pesticidas. A transformação da azeitona só é permitida em determinados lagares, que assegurem a completa separação em relação ao circuito do azeite convencional. Em Portugal está instituído um sistema de controlo, AICEP Portugal, que abrange todo o circuito desde a produção à comercialização.

- **Azeite de Quinta**

Azeites em que todas as operações desde o cultivo da oliveira até ao embalamento são efetuados na área de exploração da quinta. Ainda não têm legislação regulamentar.

- **Azeite Elementar ou Monovarietal**

Azeites obtidos a partir de uma só variedade de azeitona.

- **Blends**

Mistura de azeites monovarietais.

1.4. Classificação do Azeite [19]

Existem no mercado vários tipos de azeite, com diferentes características. De acordo com a legislação vigente designam-se do seguinte modo:

Azeites Virgens

Obtidos unicamente do fruto da oliveira por processos mecânicos e/ ou físicos, em condições que não alteram o produto e que não sofrem outro tipo de tratamento para além da lavagem, da decantação, da centrifugação e da filtração, exceto os azeites obtidos com solventes, com adjuvantes de ação química ou bioquímica, por reesterificação, ou qualquer mistura com óleos de outra natureza.

- **Azeite virgem extra**, azeite com boas características organoléticas que não apresenta defeitos, com sabor e cheiro intenso a azeitona saudável, e com acidez não superior a 0,8% em ácido oleico.
- **Azeite virgem**, extraído da azeitona por processos mecânicos e/ou físicos, em condições que não alterem o produto, apresenta uma acidez máxima de 2%. Pode apresentar ligeiros defeitos de cheiro e sabor.
- **Azeite lampante**, azeite virgem que possui características organoléticas anormais, com acidez superior a 2 graus, e normalmente é destinado à refinação ou a transformação industrial.

Azeite Refinado

Azeite obtido por refinação de azeite virgem com acidez não superior a 0,3%.

Azeite

Mistura de azeite refinado e azeite virgem, excluindo o azeite lampante, com uma acidez não superior a 1%. Apresenta defeitos a ser eliminados na refinação.

Óleo de bagaço de azeitona bruto

Mistura de óleo de bagaço de azeitona com azeite lampante.

Óleo de bagaço de azeitona refinado

Óleo obtido pela refinação de óleo de bagaço de azeitona bruto, com uma acidez não superior a 0,3%.

Óleo de bagaço de azeitona

Óleo obtido da mistura de óleo de bagaço de azeitona refinado com azeite virgem, possui acidez superior a 1,5%.

1.5. Composição química do azeite

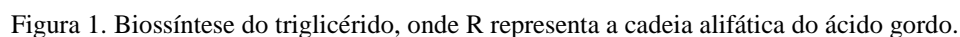
Do ponto de vista químico, como todos os óleos vegetais, o azeite é constituído por duas frações, uma saponificável e outra insaponificável [20-22].

A fração saponificável, insolúvel em água e que permite a formação de sabões por hidrólise em meio alcalino, constitui cerca de 97 a 99% da massa total do azeite e determina maioritariamente muitas das suas características físicas, químicas e metabólicas [23]. Esta fração integra triglicéridos, ácidos gordos livres responsáveis pela acidez do azeite, e ainda componentes menores como os fosfolípidos, pigmentos verdes e glucósidos [22].

Já a fração minoritária integra um conjunto muito variado de substâncias como hidrocarbonetos, esteróis, ceras, álcoois triterpénicos, pigmentos carotenoides, vitaminas, tocoferóis, polifenóis e substâncias voláteis [18, 22, 24]. Embora estejam numa pequena fração no azeite, a presença destas substâncias revela-se de elevada importância, tanto a nível nutricional como a nível de estabilidade e qualidade organolética do azeite. Muitas vezes utilizadas como critério de qualidade e de autenticidade [21, 25].

1.5.1. Fração Maioritária – Saponificável

Um dos parâmetros mais utilizados no controlo de qualidade de azeites é a composição em ácidos gordos, presentes maioritariamente sob a forma de triglicéridos, Figura 1, e numa quantidade residual de mono e diglicérideos [26].



Triglicérido	Porcentagem
OOO Trioleína	40 - 59%
POO Palmitodioleína	12-20%
OOL Linoleodioleína	12,5-20%
POL Palmitooleolinoleína	5,5-7%
SOO Estearodioleína	3-7%

Esta composição mantém-se constante nos azeites, variando apenas as percentagens, devido à variedade e ao estado da azeitona, às condições climáticas, região onde foi cultivada, quantidade de água, altitude, grau de maturação e processos tecnológicos envolvidos na obtenção do óleo [22, 27-29].

	Porcentagem
Gordura Monoinsaturada	53-87%
Ácido oleico	63-83%
Gordura Saturada	5-15%
Gordura Polinsaturada	4-20%
Família Ómega 6	3-14%
Família Ómega 3	Até 1,5%

11

No azeite, o ácido oleico é o ácido gordo maioritário que representa cerca de 55 a 83% dos ácidos gordos totais [30], Tabela 4.

Designação abreviada	Ácido Gordo	Estrutura	Percentagem
C12:0	Ácido Láurico	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{10}\text{COOH}$	Vestígios
C14:0	Ácido Mirístico	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{12}\text{COOH}$	0,0-0,1%
C16:0	Ácido Palmítico	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{14}\text{COOH}$	7,5-20%
C16:1 Δ^9	Ácido Palmitoléico	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_5\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$	0,3-3,5%
C17:0	Ácido Heptadecanóico	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{15}\text{COOH}$	0,0-0,5%
C17:1 Δ^9	Ácido Heptadecenóico	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_6\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$	0,0-0,6%
C18:0	Ácido Estearico	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{16}\text{COOH}$	0,5-5,0%
C18:1 Δ^9	Ácido Oleico	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_7\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$	55-83%
C18:2 $\Delta^{9,12}$	Ácido Linoleico	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4(\text{CH}=\text{CHCH}_2)_2(\text{CH}_2)_6\text{COOH}$	3,5-21%
C18:3 $\Delta^{9,12,15}$	Ácido Linolénico	$\text{CH}_3\text{CH}_2(\text{CH}=\text{CHCH}_2)_3(\text{CH}_2)_6\text{COOH}$	0,0-1,5%
C20:0	Ácido Araquídico	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{18}\text{COOH}$	0,0-0,8%
C20:1 Δ^9	Ácido Gadoleico	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_9\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$	Vestígios
C22:0	Ácido Beénico	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{20}\text{COOH}$	0,0-0,2%
C24:0	Ácido Lignocérico	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{22}\text{COOH}$	0,0-1%

Tabela 4. Percentagem de ácidos gordos no azeite, adaptado [30].

Podem ainda encontrar-se, em pequenas quantidades, monoglicéridos e diglicéridos, que surgem devido à biossíntese incompleta de triglicéridos ou a reações hidrolíticas [20, 31-32]. A quantidade de monoglicéridos é inferior a 0,25% e a de diglicéridos varia entre 1,0 e 2,8% [26].

1.5.2. Fração Minoritária – Insaponificável

A fração solúvel em água encontra-se em quantidades muito inferiores, representando cerca de 2% da massa total do azeite.

O azeite e a azeitona são uma fonte natural de antioxidantes que através de diversos mecanismos atuam como forma protetora contra espécies reativas de oxigénio captando radicais livres pela doação rápida de um átomo de hidrogénio, aceitando igualmente iões metálicos como o ferro e o cobre com capacidade de iniciarem a produção de radicais livres [7, 8, 33]. Assim atuam igualmente como anti mutagénicos, uma vez que impedem a ocorrência de mutações de genes [34]. São exemplos os carotenoides e os compostos fenólicos.

Os compostos fenólicos devem ser considerados quando se avalia a qualidade de um azeite, visto que apresentam potencial antioxidante e contribuem para a estabilidade do azeite contra a oxidação. Sendo também compostos que elevam o valor nutricional uma vez que são protetores contra o cancro, doenças do coração e atuam sobre o *stress* oxidativo [32].

Estes compostos estão também relacionados com as qualidades sensoriais do azeite pois são particularmente associados ao sabor amargo e pungente do azeite [7, 19].

No azeite estão presentes várias classes de compostos fenólicos, são eles os álcoois fenólicos, os ácidos fenólicos, os flavonoides, os lignanos, os secoiridóides, e por último mas não menos importantes, os tocoferóis pois são os antioxidantes fenólicos mais comuns provenientes de fonte natural [35].

Os álcoois fenólicos mais comuns no azeite são o hidroxitirosol, o tirosol e o acetato de hidroxitirosol [36-37], Figura 2. A concentração destes compostos normalmente é baixa, no entanto devido à hidrólise dos secoiridóides existentes no azeite que contêm hidroxitirosol e tirosol na sua estrutura, aumenta durante o armazenamento [38-39].

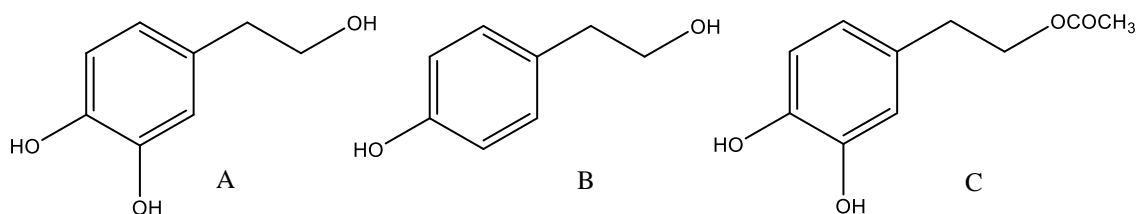


Figura 2. Estrutura química dos álcoois fenólicos e seu derivado mais comum no azeite.
A: hidroxitirosol; B: tirosol; C: acetato de hidroxitirosol

O ácido vanílico, o siríngico, o *p*-cumárico e o ácido cafeico foram dos primeiros fenóis observados no azeite virgem [40-41], Figura 3.

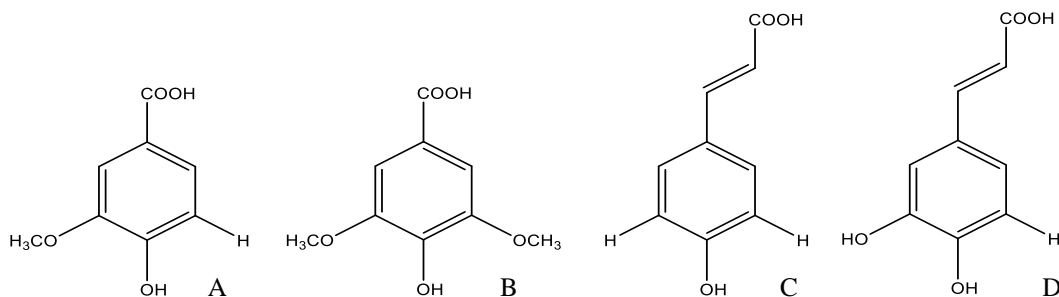


Figura 3. Estrutura química dos ácidos fenólicos.
A: ácido vanílico; B: ácido siríngico; C: ácido *p*-cumárico; D: ácido cafeico

Os flavonoides estão presentes no azeite em concentrações muito baixas. Estes são um grupo de fenóis bastante diversificado e subdivididos em várias classes, as catequinas, as antocianinas, os flavonóis, as flavonas, entre outras. No azeite estão presentes essencialmente flavonas como a luteolina e a apiginina [42-43], Figura 4.

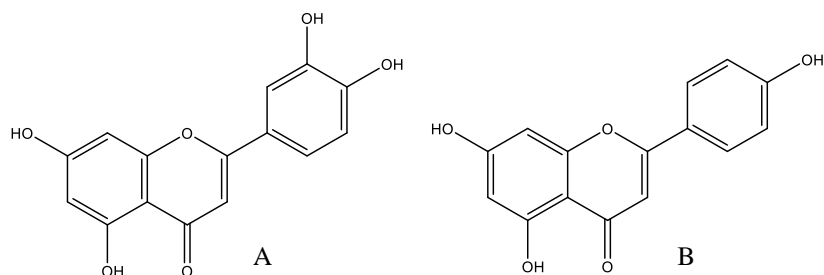


Figura 4. Estrutura química das flavonas.
A: luteolina; B: apiginina

Já os lignanos possíveis de isolar no azeite são o pinoresinol e o (+)-acetopinoresinol. São compostos fenólicos estáveis durante o armazenamento do óleo [38-39].

Outros compostos fenólicos presentes são os secoiridóides que se caracterizam pela presença do ácido elenólico ou derivado na sua estrutura. São compostos que só se encontram em plantas da família *Oleaceae*, como é o caso da oliveira [44].

No azeite, também existem vitaminas lipossolúveis, como a vitamina A ou retinol, a vitamina D ou calciferol, a vitamina K e a vitamina E ou α -tocoferol.

Todos os tocoferóis estão presentes, no entanto o α -tocoferol representa cerca de 95% do peso total de tocoferóis [45]. Estes contribuem para a proteção dos ácidos gordos polinsaturados contra a oxidação, influenciando assim indiretamente a composição do aroma.

Outros compostos responsáveis pelo sabor e odor do azeite são compostos com aroma.

Os pigmentos de clorofilas e carotenoides são responsáveis pela cor do produto [32]. A presença destes compostos varia em função do fruto, da variedade, do grau de maturação, das condições ambientais e do processo de extração e armazenamento. Estes compostos funcionam com atividade antioxidativa no escuro e atividade pró oxidante quando expostos à luz, tendo assim um papel preponderante na atividade oxidativa de alimentos processados [46-47].

Os carotenoides com os polifenóis e os tocoferóis têm um efeito sinérgico de antioxidantes e anti carcinogénicos e fornecem estabilidade oxidativa ao azeite.

Além destes, existem outros pigmentos nos azeites virgens, como a luteína e o β -caroteno [46].

1.6. Produção do Azeite [11]

O processo utilizado na produção do azeite influencia a composição final do aroma, Figura 5.

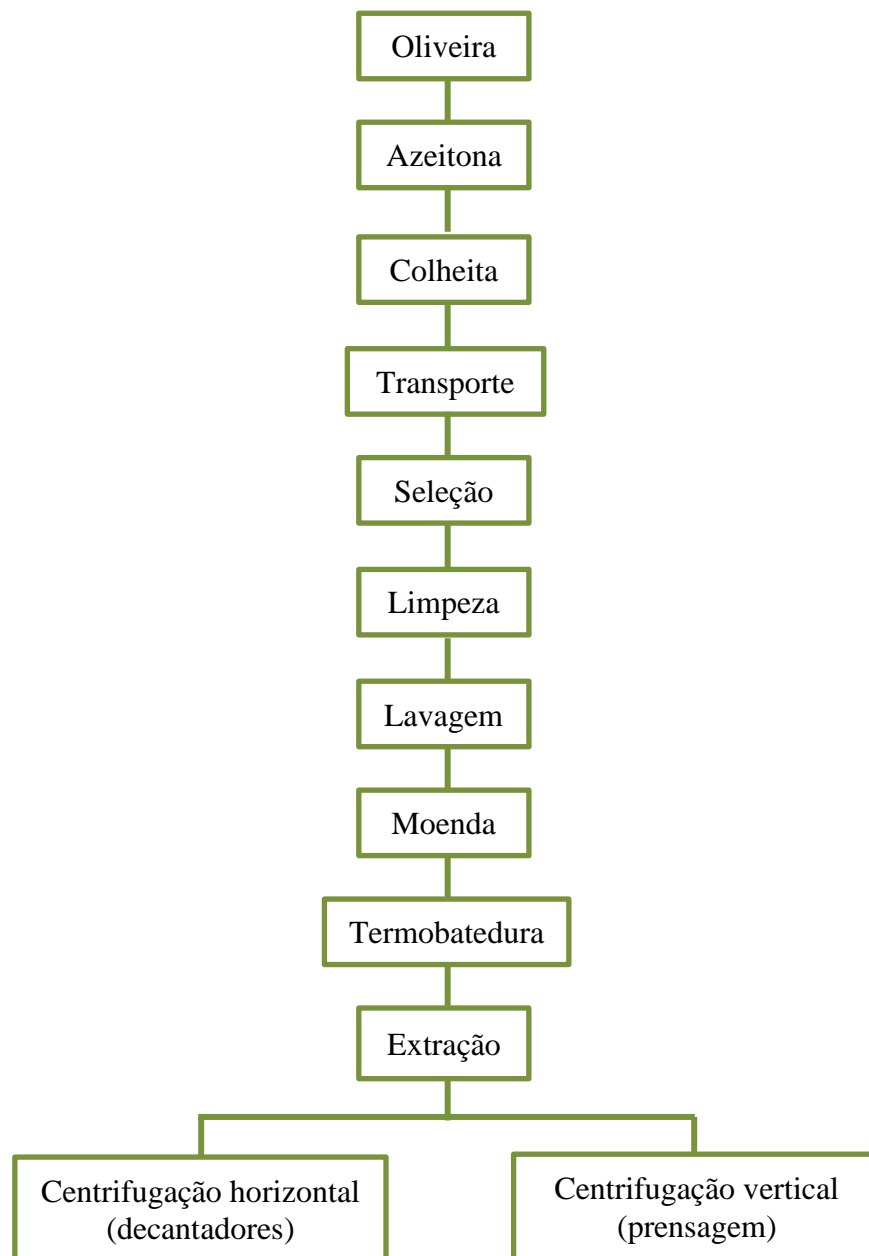


Figura 5. Esquema da produção do azeite, adaptado [11].

A oliveira é uma árvore de crescimento lento e de porte médio, e tradicional na bacia do Mediterrâneo [18, 48]. Variações climáticas influenciam o seu desenvolvimento, por exemplo temperaturas abaixo de 0 °C afetam a produção, no entanto suportam bem as secas e os ventos fortes. É uma árvore que só produz azeitona a partir do quarto ano de vida e só dá flor uma vez

por ano. Esta atinge a sua maturidade produtiva aos 10 anos, continuando em produção durante décadas, quando está madura produz em média 50 quilogramas de azeitonas e cerca de 8 litros de azeite. As azeitonas amadurecem entre Outubro e Fevereiro, e são sempre de cor verde tornando-se violeta e por fim preta, à medida que amadurecem.

Para produzir o sumo da azeitona é necessário, primeiramente fazer a colheita destas. A colheita continua a ser um trabalho artesanal duro, apesar da evolução tecnológica ao longo dos séculos e da introdução da mecanização, pois esta acontece durante a estação fria, entre Outubro e Fevereiro. Existem três tipos de colheita, a manual, o varejamento que consiste em bater nas árvores com uma vara fazendo as azeitonas caírem e a vibração mecânica que possibilita a colheita mecanicamente através de vibrações de tronco ou ramos.

Após a colheita as azeitonas são transportadas rapidamente para prevenir o esmagamento e a fermentação destas.

Já no lagar as azeitonas são classificadas segundo o estado sanitário, a maturação e a variedade, de modo a não comprometer a qualidade do azeite.

Após isto, as azeitonas são limpas, passando por uma corrente de ar de forma a remover ramos e folhas. Depois de eliminadas todas as impurezas, as azeitonas são lavadas com água fria.

Posteriormente, são sujeitas à moenda, onde é moída com caroço, formando uma pasta espessa. Esta pasta é sujeita à termobatedura, ou seja é agitada e aquecida durante 45 minutos a uma temperatura controlada inferior a 30°C.

Por último, o azeite é separado da fase sólida, polpa, pele e caroço, por uma centrifugação, que pode ser horizontal que separa pela densidade, ou vertical que remove a água e quaisquer impurezas.



Figura 6. Esquema de produção do azeite, adaptado [11].

Para garantir a qualidade do azeite é necessário fazer uma seleção, classificando-o de acordo com as suas propriedades químicas e organoléticas, de modo a prosseguir para o loteamento, Figura 6.

1.7. Seleção e Qualidade

A qualidade de um azeite é afetada por vários fatores químicos, tecnológicos, sensoriais, entre outros.

Para determinar a qualidade existem legislações específicas definidas em regulamentos europeus, Regulamento (CEE) nº 2568/91 da Comissão de 11 de Julho publicado no Jornal Oficial das Comunidades Europeias nº 34 L248, de 5 de Setembro de 1991, e no Conselho Oleícola Internacional (COI) que estabelecem os parâmetros que devem ser analisados como o índice de acidez, o índice de peróxidos, a análise espectrofotométrica no UV, o perfil lipídico e a análise sensorial, de modo a garantir ao consumidor um produto de qualidade [19].

Porém existem outros parâmetros que possuem um efeito significativo na estabilidade e características sensoriais do azeite que devem ser estudados como é o caso dos polifenóis, da densidade, da viscosidade e da cor [49-50].

1.8. Classificação Físico-Química

Acidez

A acidez do azeite é a resultado de danos nos tecidos que propiciam a ação das lípases que hidrolisam os triglicéridos, formando ácidos gordos livres, conduzindo assim ao aumento de acidez. Estes danos nos tecidos podem ser causados por diversos fatores como a infestação do fruto por insetos (moscas), frutos doentes devido a fungos, atrasos na colheita do fruto, contacto entre a água e o azeite após a extração, métodos de extração defeituosos ou tardios, armazenamento não adequado, entre outros [51].

Embora não tenha uma relação direta com a alteração do sabor, a acidez é um parâmetro negativo. O azeite proveniente de azeitonas sadias possui 0% de acidez, e quanto menor o grau de acidez maior é a sua qualidade. A medição da acidez é expressa em grama de ácido oleico por 100 grama de óleo e que para azeites virgem está regulamentado não poder ultrapassar os 2%, limite a partir do qual deixa de ser apto para consumo e tem de ser refinado [52].

Índice de Peróxidos

Para avaliar o estado de oxidação inicial do azeite mede-se o índice de peróxidos. Estes são produtos formados a partir da oxidação de óleos e gorduras devido à ação do oxigénio, que em mínimas quantidades podem alterar o sabor. Assim, é importante determinar o índice de peróxidos para evitar a formação de odores e atributos de sabor menos positivos no azeite, como é o caso do ranço [30].

Este parâmetro é medido em miliequivalentes de oxigénio ativo por quilograma de óleo, e o limite legal para azeites virgem é de 20 meq O₂/kg segundo o Regulamento (CEE) n° 2568/91 [19].

Absorvância no ultra violeta

A absorvância no ultra violeta é analisada para avaliar a autenticidade e verificar a qualidade do azeite, esta deteta a presença de compostos oxidados anormais [52]. A absorvância é medida a vários comprimentos de onda podendo determinar os coeficientes específicos, k_{270} (270 nm), k_{232} (232 nm) e delta k. Os hidroperóxidos conjugados absorvem a 232 nm, enquanto que os produtos de oxidação secundária, aldeídos e cetonas, absorvem a outros comprimentos de onda, e os dienos e trienos conjugados absorvem a 270 nm. Para azeites virgem extra os limites, segundo o Regulamento (CEE) n° 2568/91 [19], são de 2,5 para K_{232} , 0,22 para K_{270} e 0,01 para delta K. Quanto mais baixos estes valores melhor a qualidade do azeite [32, 53].

Cor

A cor do azeite não está relacionada com a qualidade, mas com o estado fitossanitário das azeitonas. Isto depende apenas dos compostos biológicos, como os pigmentos de clorofila e os carotenoides, presentes na azeitona [32]. A presença destes depende do modo de cultivo fruto, do solo, das condições climáticas e do processo de extração [54]. As azeitonas verdes devido ao alto teor de clorofila originam um azeite verde, enquanto que azeitonas maduras originam um azeite amarelo devido à presença de carotenoides. Também a luz pode influenciar a cor, uma vez que a clorofila quando exposta à luz promove a formação de radicais de oxigénio, acelerando a oxidação, mas na ausência de luz age como antioxidante. Assim a combinação dos pigmentos determinam qual a cor final do produto que pode variar desde dourado intenso a verde escuro [51].

1.9. Classificação Organolética

São muitas as vezes que os consumidores procuram e utilizam os atributos de um produto para avaliar a qualidade deste, geralmente a cor, a textura, a viscosidade, o sabor e o cheiro são as primeiras características sensoriais que um consumidor visualiza e avalia [55]. No caso do azeite, o aroma é sem duvida um dos maiores requisitos, uma vez que é um fator importante para a escolha do consumidor e também por ser uma característica que facilmente sofre alterações quando ocorre deterioração [56].

Comercialmente, durante muitos anos o critério principal para determinar a qualidade do azeite foi a acidez. No entanto para fazer face à competitividade no mercado oleícola foi necessário introduzir requisitos de qualidade. Em 1991 as normas europeias introduziram pela primeira vez outros parâmetros químicos e organoléticos com o Regulamento (CEE) nº 2568/91 da Comissão de 11 de Julho publicado no Jornal Oficial das Comunidades Europeias nº 34 L248, de 5 de Setembro de 1991 [19].

Posto isto, o azeite tornou-se o único produto com prova organolética obrigatória legalmente como parte do seu controlo de qualidade [57]. As características organoléticas são definidas por um painel de provadores especializados para o efeito, e as sensações percebidas são designadas por atributivos positivos quando são agradáveis e atributos negativos quando não são.

Os atributos mais comuns do azeite quando o fruto é sadio, fresco e colhido no tempo certo de maturação e não alterado posteriormente, são frutado, amargo e picante. No entanto, existem diversos fatores como o amadurecimento, mudanças biológicas, oxidação, contaminação, e armazenamento defeituoso, que podem levar ao aparecimento de sensações desagradáveis denominadas por atributos negativos, sendo os mais comuns a tulha, o ranço e o mofo [27, 58].

De acordo com o Regulamento CEE nº 2568/91 são definidos os seguintes atributos para o azeite [19].

1.9.1. Atributos positivos

Frutado: conjunto das sensações olfativas, dependentes da variedade de azeitona, por via direta e/ou retronasal, características dos azeites provenientes de frutos sãos e frescos, verdes ou maduros.

Amargo: gosto elementar característico dos azeites obtidos de azeitonas verdes ou em fase precoce de maturação, sentido pelas papilas caliciformes que constituem o V lingual.

Picante: sensação tátil de picadas em toda a cavidade bucal, em especial na garganta, característica dos azeites produzidos no início da campanha, principalmente a partir de azeitonas ainda verdes.

1.9.2. Atributos negativos

Tulha/Borra: «*Flavour*» característico dos azeites obtidos de azeitonas amontoadas ou armazenadas em condições que as colocaram num estado avançado de fermentação anaeróbia ou dos azeites que permaneceram em contacto, nos depósitos e reservatórios subterrâneos, com matérias decantadas que tenham também sofrido um processo de fermentação anaeróbia.

Mofa-húmido-terra: «*Flavour*» característico dos azeites obtidos de azeitonas atacadas por bolores e leveduras devido à armazenagem dos frutos durante vários dias em condições húmidas ou dos azeites obtidos de azeitonas colhidas com terra ou lama que não foram lavadas.

Avinhado-avinagrado-ácido-azedo: «*Flavour*» característico de certos azeites que lembra o vinho ou o vinagre. Deve-se, fundamentalmente, a um processo fermentativo aeróbio das azeitonas ou de restos de pasta de azeitona em capachos que não foram lavados corretamente, que leva à formação de ácido acético, acetato de etilo e etanol.

Ranço: «*Flavour*» dos azeites que sofreram um processo de oxidação intenso.

Azeitona queimada (madeira húmida): «*Flavour*» característico dos azeites extraídos de azeitonas que congelaram na oliveira.

Cozido ou Queimado: «*Flavour*» característico dos azeites devido a aquecimento excessivo e/ou prolongado durante a obtenção dos mesmos, principalmente durante a termomalaxagem da pasta, se esta for realizada em condições térmicas inadequadas.

Feno-madeira: «*Flavour*» característico de certos azeites provenientes de azeitonas secas.

Encorpado: sensação buco-tátil densa e pastosa produzida por certos azeites velhos.

Lubrificantes: «*Flavour*» dos azeites que lembra o gasóleo, massas consistentes ou óleos minerais.

Água-ruça: «*Flavour*» adquirido pelos azeites devido a contacto prolongado com águas-ruças que sofreram processos de fermentação.

Salmoura: «*Flavour*» dos azeites obtidos de azeitonas conservadas em salmoura.

Metálico: «*Flavour*» que lembra os metais e é característico dos azeites que permaneceram prolongadamente em contacto com superfícies metálicas durante os processos de trituração, malaxagem, prensagem ou armazenagem.

Esparto: «*Flavour*» característico dos azeites obtidos de azeitonas prensadas em capachos de esparto novos. Pode variar consoante se trate de capachos fabricados de esparto verde ou de esparto seco.

Gafa: «*Flavour*» dos azeites obtidos de azeitonas fortemente atacadas por larvas da mosca da oliveira (*Bactrocera oleae*).

Pepino: «*Flavour*» dos azeites característico de um acondicionamento hermético excessivamente prolongado, nomeadamente em latas. É atribuído à formação de 2,6-nonadienal.

A avaliação das características organoléticas dos azeites seguida de classificação deve-se à estimulação dos recetores olfativos por inalação de compostos voláteis e semi-voláteis, mesmo que em concentrações baixas.

1.10. Fatores de deterioração

A composição volátil do azeite é influenciada por vários fatores, desde o cultivo, a região geográfica, o amadurecimento e colheita da azeitona, métodos de processamento, armazenamento, entre outros.

Uma das principais causas de deterioração é a oxidação lipídica, um fenómeno espontâneo e inevitável, e por isso um desafio para a indústria e investigação da área alimentar [59].

Esta reação que envolve reações de interação entre ácidos gordos insaturados e espécies reativas de oxigénio, leva a alterações no azeite como a aparência, a textura, o tempo de vida útil, as características nutricionais e organoléticas do azeite [60].

Os lípidos quando sujeitos a diversos fatores ficam suscetíveis à oxidação. Por exemplo a luz favorece a reação do azeite com o oxigénio e temperaturas superiores a 20°C promovem a formação de peróxidos e posterior decomposição em aldeídos e cetonas. Já o oxigénio quando entra em contacto com o azeite leva à oxidação do mesmo, sendo que quanto mais prolongado no tempo for o contacto maior será o processo de oxidação. Os metais catalisam a auto oxidação e a rancificação do azeite, podendo atribuir um sabor metálico ao azeite, e ainda as enzimas que são outro fator que pode levar à oxidação [59, 61]

Os produtos primários da oxidação do azeite são os peróxidos. Quando este tipo de reação acontece leva a formação de produtos com sabor e odor desagradáveis que poem muitas vezes em causa as propriedades nutricionais e sensoriais do azeite. Quando as reações de oxidação ocorrem, os ácidos gordos essenciais, como o ácido linoleico e o ácido linolénico, e algumas vitaminas lipossolúveis, são destruídos. No caso dos ácidos carboxílicos referidos, estes podem ser oxidados por auto oxidação, fotoxidação, lipólise e oxidação enzimática [53, 59, 62], Figura 7.

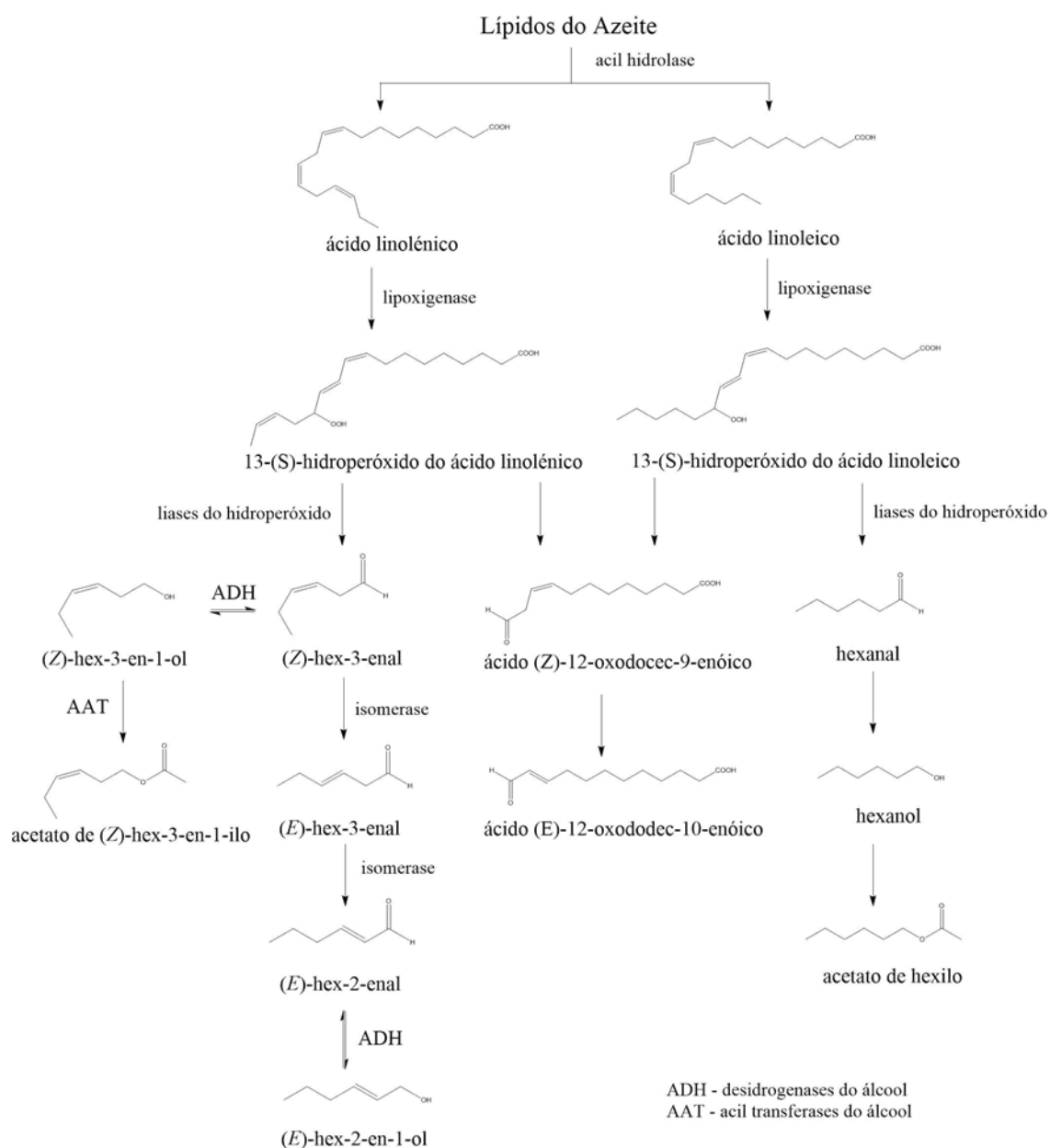


Figura 7. Esquema do mecanismo da oxidação enzimática dos ácidos linolénico e linoleico, adaptado [63].

1.11. Aroma, Sabor e Gosto

O olfato é dos cinco sentidos o mais complexo e único em estrutura e organização [64]. A percepção olfativa depende da estrutura química dos compostos e da pessoa, pois cada cérebro interpreta de modo diferente a sensação que afeta o órgão olfativo. Esta percepção ocorre quando os compostos odorantes acedem ao sistema olfativo por via nasal ou bucal e se difundem no muco que banha o epitélio olfativo, podendo interagir com as células dos cílios olfativos [65-68], Figura 8.

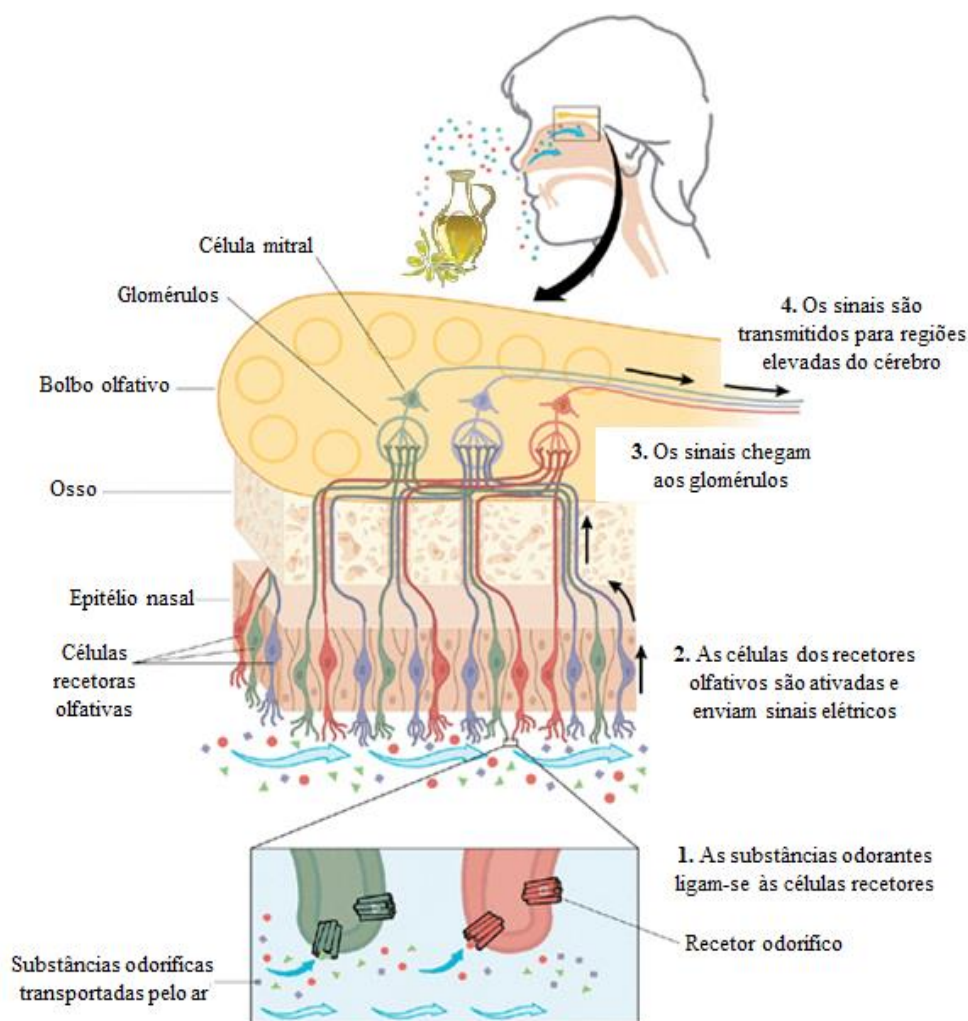


Figura 8. Esquema do sistema olfativo, adaptado [69].

Para que uma substância seja detetada odorificamente é necessário que um número mínimo de moléculas odorantes esteja em contato com os recetores por certo período de tempo para permitir as interações necessárias à percepção olfativa. As moléculas têm de possuir pelo menos três características físico-químicas fundamentais: volatilidade suficiente de modo a penetrar o ar próximo à área sensorial; alguma solubilidade em água para passar pela membrana mucosa e pelas células olfativas; e serem lipossolúveis para que percorram as terminações nervosas através das membranas lipídicas [70].

Substâncias como aldeídos, cetonas, polifenóis, clorofilas, entre outros, são os responsáveis pela estimulação dos recetores sensoriais humanos pelo azeite. Estas substâncias interferem nas características gustativas, de aroma e de coloração dos azeites.

Uma vez que o azeite é simplesmente sumo de azeitona, consumido sem qualquer tratamento químico, os compostos voláteis que compõem o óleo permanecem retidos, sendo estes compostos

e alguns compostos fenólicos que dão aroma e sabor ao azeite, mesmo que em concentrações baixas.

Os compostos voláteis do azeite, mesmo em baixos limiares olfativos, são cruciais para a qualidade, pois compreendo as vias de formação e degradação destes, é possível estabelecer marcadores de defeito ou de qualidade [71-72].

Os compostos que compõem o perfil de aroma do azeite provêm de várias vias e metabolismos diferentes, como indica a Figura 9.

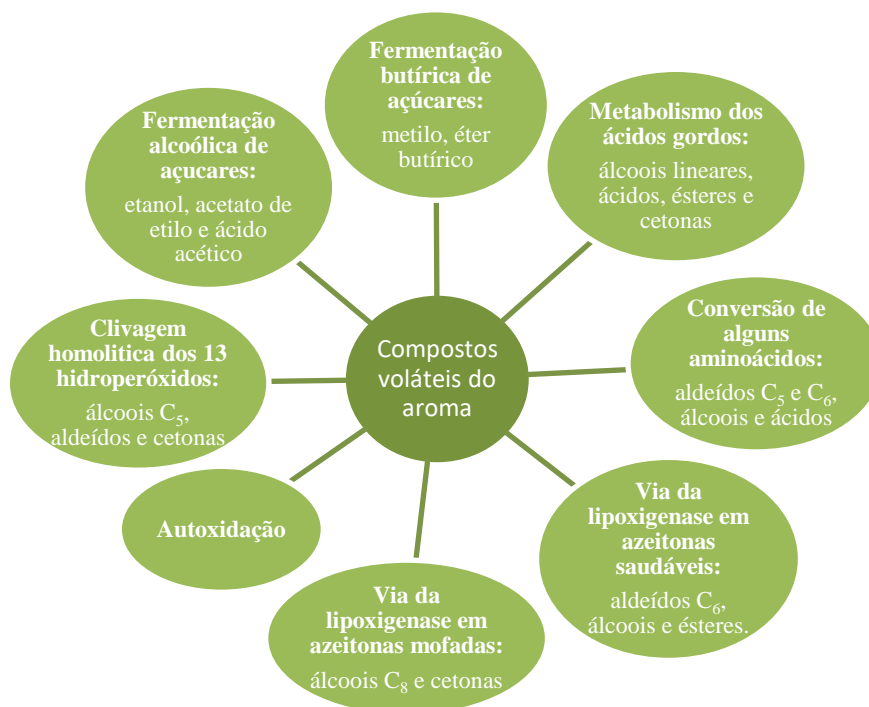


Figura 9. Principais vias envolvidas na formação do perfil volátil do aroma do azeite, adaptado [71-72].

O azeite possui um sabor distinto devido à sua complexa composição de compostos voláteis pertencentes a várias classes químicas. Estes compostos estimulam os recetores gustativos e olfativos dando origem a um aroma e sabor equilibrado a verde e frutado.

No entanto, podem surgir defeitos, que normalmente provêm da oxidação e de vias enzimáticas.

Durante o armazenamento o perfil dos compostos do azeite é alterado, verificando-se a formação de atributos negativos como o ranço, a tulha e o mofo, devido principalmente à oxidação secundária de lípidos [73-76]. Esta alteração acontece mesmo quando o azeite é armazenado a baixas temperaturas e na ausência de luz, no entanto quando este está em loja não é possível pelo fabricante controlar as condições a que o azeite está exposto, levando muitas vezes a que o consumidor detete a presença de atributos não desejáveis. Assim, o armazenamento em prateleira

pode levar a elevados prejuízos para os fabricantes oleícolas, uma vez que o azeite fica impróprio para o consumo e impossibilitando a sua venda.

É de grande preocupação para as empresa agradar o consumidor, focando-se sempre em atingir a melhor qualidade, sendo que um dos maiores cuidados é a consistência organolética do produto e a monitorização de contaminantes.

Neste contexto, a Azeite Gallo entrou em contacto com o *Resolution Lab*, propondo o desenvolvimento de estratégias analíticas que permitissem traçar o perfil dos compostos presentes em diferentes tipos de amostras de azeite, e a determinação de marcadores precoces para atributos positivos e negativos, que permitem estimar a durabilidade de um azeite engarrafado em armazém. O principal objetivo deste trabalho foi estudar quais os marcadores precoces de defeito e a validade de um azeite engarrafado, para posteriormente transferir o conhecimento à empresa de modo à sua utilização interna.

A origem da empresa Azeite Gallo, fundada por Victor Guedes, remonta-nos aos finais do século XIX, mais propriamente a 1860, data da fundação de um estabelecimento, em Abrantes.

Foi em 1919, que a Gallo se tornou uma marca registada, evoluindo sempre ao longo dos anos, Figura 10, tornou-se a 3ª maior marca de azeite do mundo, está presente em mais de 40 países, e é conhecida por produzir azeite com um sabor único e peculiar. É uma referência na categoria em países como Portugal, Brasil, Venezuela e Angola [11].



Figura 10. Evolução do logótipo Gallo, adaptado [11].

Capítulo 2. Parte Experimental

2. Parte Experimental

2.1. Amostras

Foram fornecidos pela Victor Guedes 2 tipos de amostras de azeite, Arbequina e Comunitário. A estas amostras foram misturadas amostras de azeite com defeito evidente. As amostras fornecidas foram dopadas na empresa com exíguas quantidades dos atributos mofo, tulha e ranço, de modo a que o painel sensorial não identificasse o defeito.

Todas as amostras foram submetidas a triagem pelo painel sensorial da Victor Guedes.

Foram fornecidas as amostras com as seguintes designações:

- Azeite Comunitário sem presença de defeito - CO
- Azeite Comunitário dopado com o defeito ranço - COR
- Azeite Comunitário dopado com o defeito tulha – COT
- Azeite Comunitário dopado com o defeito mofo – COM
- Azeite Arbequina sem presença de defeito – AR
- Azeite Arbequina dopado com o defeito ranço – ARR
- Azeite Arbequina dopado com o defeito tulha – ART
- Azeite Arbequina dopado com o defeito mofo – ARM

Foram ainda fornecidas amostras de azeite dopadas em grande quantidade com os defeitos tulha, ranço e mofo, para servirem de padrão de presença de defeito.

Além disto foram fornecidas várias garrafas seladas do mesmo tipo de amostra, de modo a que todos os meses se abrisse uma garrafa nova, reproduzindo assim as condições de armazenamento em prateleira.

2.2. Classificação Físico-Química e Organolética

A classificação físico-química e organolética foi realizada na empresa Victor Guedes segundo o Regulamento (CEE) Nº 2568/91 da Comissão de 11 de Julho de 1991 [19], relativo às características dos azeites e dos óleos de bagaço de azeitona, bem como aos métodos de análise relacionados.

2.3. Extração e Análise das Amostras

HS-SPME: 4 mL de cada amostra foram submetidos a SPME por Headspace (HS-SPME) com uma fibra de 50/30 µm DVB/Carb/PDMS de 1 cm em vial de 22 mL. A amostra foi equilibrada 10 minutos a 50 °C e de seguida extraída 50 minutos a esta temperatura. A desorção térmica dos analitos decorreu expondo a fibra ao injetor do GC a 260 °C durante 3 minutos em splitless.

GC/Espectrometria de massa (GC/MS): Utilizou-se um cromatógrafo Bruker Scion SQ 456 GC-MS. Foi utilizado um amostrador automático CTC-CombiPal e os dados adquiridos com o sistema MSWS 8.2 Bruker e analisados com Bruker MS Data Review 8.0. A separação cromatográfica decorreu num sistema de colunas acopladas: coluna capilar ZB-WAX PLUS (30 m x 0.25 mm i.d., 0.25 µm df) acoplada com uma coluna capilar ZB-5 MS (30 m x 0.25 mm i.d., 0.25 µm df). De forma a controlar o fluxo foi utilizada uma terceira coluna capilar desativada, (30 m x 0.25 mm i.d.). Todas as três colunas são conectadas em série através de uma válvula de Deans da Valco VICI de 1/32". O programa de temperatura iniciou-se aos 40 °C, onde se manteve 5 min subindo a 4°C/min até aos 240 °C mantendo-se 5 min a esta temperatura. Foi utilizado hélio como gás de arraste, a uma pressão constante de 35.0 Psi no EFC21 e 23.0 Psi no EFC 24. A linha de transferência do MS bem como a fonte foram colocadas a 240 °C e 220 °C respetivamente.

Os espectros de massa foram comparados com a NIST MS Search Program Version 2.0g. Para determinar os fragmentos de massa a ionização eletrónica (EI) foi ajustada a 70 eV e os espectros registados entre 40 e 450 Da.

O tipo de fibra foi escolhido de acordo com vários procedimentos descritos para o azeite que validam o método de extração [77-80]. As amostras foram preparadas seguindo os procedimentos validados, sem adição de NaCl.

A análise estatística de dados multivariados foi efectuada com o programa *The Unscrambler X 10.5* (CAMO). A percentagem de área relativa de cada um dos compostos presentes nas amostras foi utilizado na análise de dados. Os dados obtidos foram submetidos em forma de matriz, estando cada uma das amostras (objetos) dispostas por linhas e cada um dos compostos (variáveis) dispostos por colunas. Antes da análise multivariada de dados, efetuou-se a sua normalização por percentagem de área em função da área total do cromatograma.

Capítulo 3. Resultados e Discussão

3. Resultados e Discussão

Foram analisados por HS-SPME-GC/MS 8 conjuntos de amostras em triplicado, de modo a determinar a evolução do perfil volátil ao longo de 480 dias (16 meses), de Abril de 2016 a Agosto de 2017.

3.1. Classificação Organolética – Painel Sensorial

Um dos aspetos mais importantes na classificação e determinação das características organoléticas do azeite é a análise sensorial. Neste caso, é definida por um painel de provadores, através de sessões de degustação, realizadas na empresa Victor Guedes. Estas sessões são de extrema importância pois este tipo de avaliação permite uma avaliação sensorial associando sabor, aroma e textura.

Na Tabela 5 estão apresentadas as amostras analisadas nos 480 dias, e indicado a encarnado o mês em que o painel sensorial da VG confirmou a presença de defeito e a laranja as amostras que já resultaram em defeito para parte do painel mas sem concordância. Para os casos de não concordância, as amostras continuam a ser consideradas “aptas” pelo painel sensorial.

Amostra/ Mês	1 30 dias	2 60 dias	3 90 dias	4 120 dias	5 180 dias	6 240 dias	7 300 dias	8 360 dias	9 480 dias
Comunitário (CO)									
CO Mofo									
CO Tulha									
CO Ranço									
Arbequina (AR)									
AR Mofo									
AR Tulha									
AR Ranço									

Tabela 5. Amostras analisadas com indicação do mês em que o defeito foi detetado pelo painel sensorial da VG (encarnado) e do mês em que parte do painel indicou a presença do defeito mas sem unanimidade (laranja).

3.2. Perfil Cromatográfico

Para o estudo do perfil cromatográfico foram fornecidas 3 amostras dopadas com defeito evidente de tulha, ranço e mofo, uma vez que contêm os compostos negativos em elevadas concentrações, Figura 11. A identificação dos compostos será apresentada mais à frente.

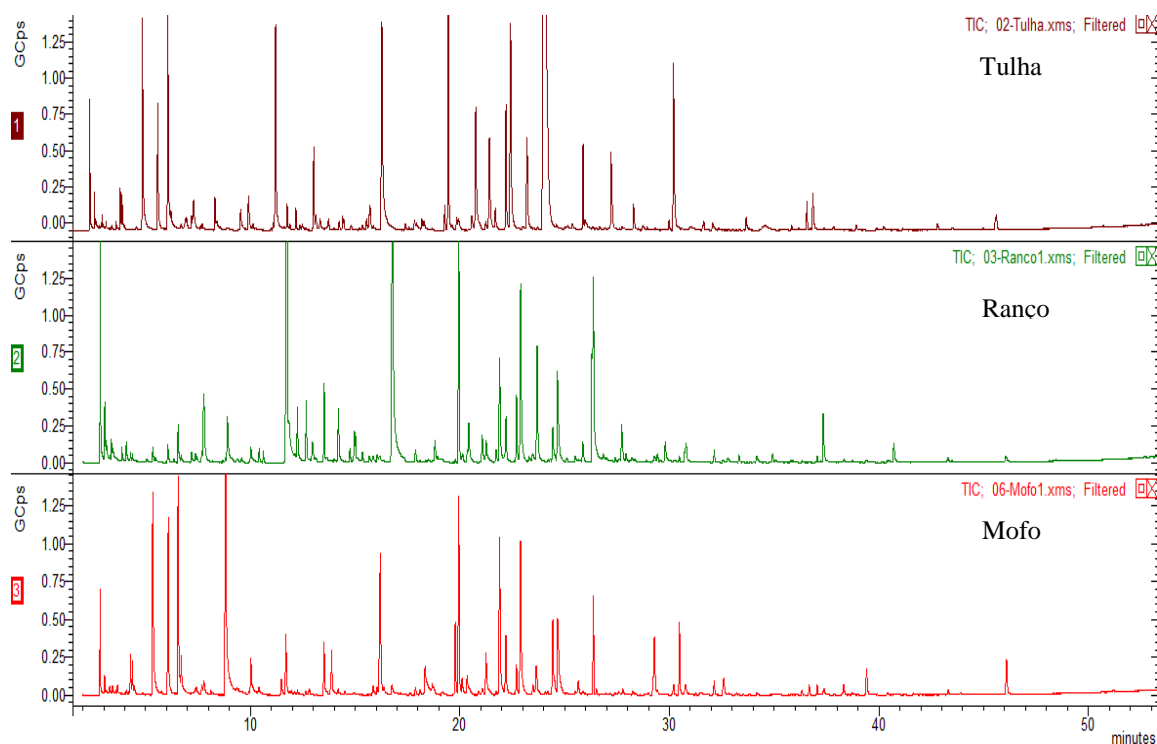


Figura 11. Cromatogramas das amostras dopadas com manifesto defeito negativo de tulha, ranço e mofo, respectivamente.

Já as figuras 12 e 13 ilustram o perfil cromatográfico das amostras Comunitário e Arbequina, a encarnado no mês em que se iniciou o estudo e a verde naquele em que o defeito foi detetado.

Após avaliação do perfil volátil das amostras verificou-se que o perfil é distinto entres estas. A proporção relativa dos compostos difere o que pode estar associado às diferenças sensoriais encontradas, como se poderá ver mais à frente após a análise por componente principal.

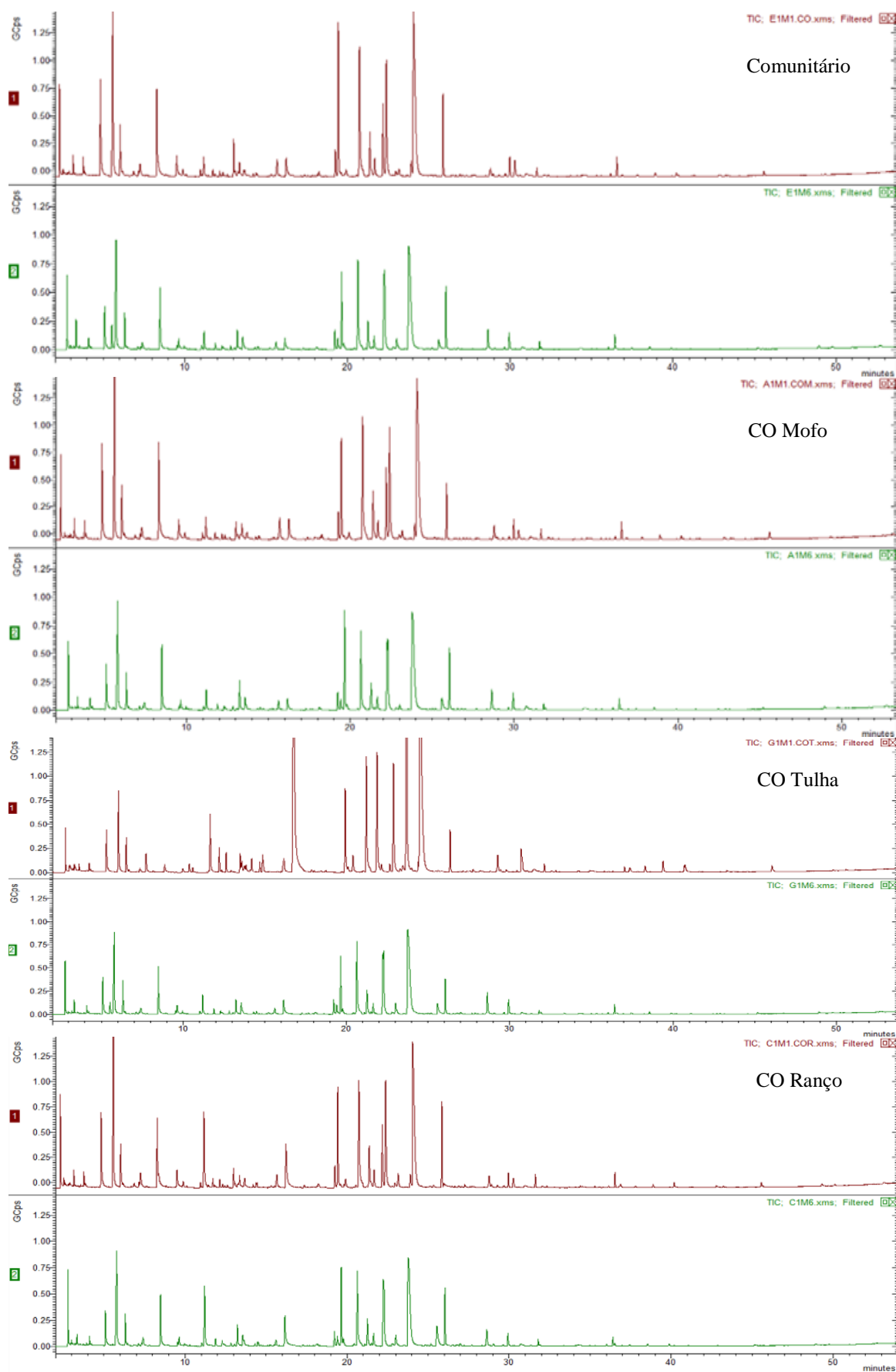


Figura 12. Cromatogramas das amostras no início e no mês em que o defeito foi detetado pelo painel sensorial da VG para a amostra Comunitário, Comunitário com defeito mofo, tulha e ranço respetivamente.

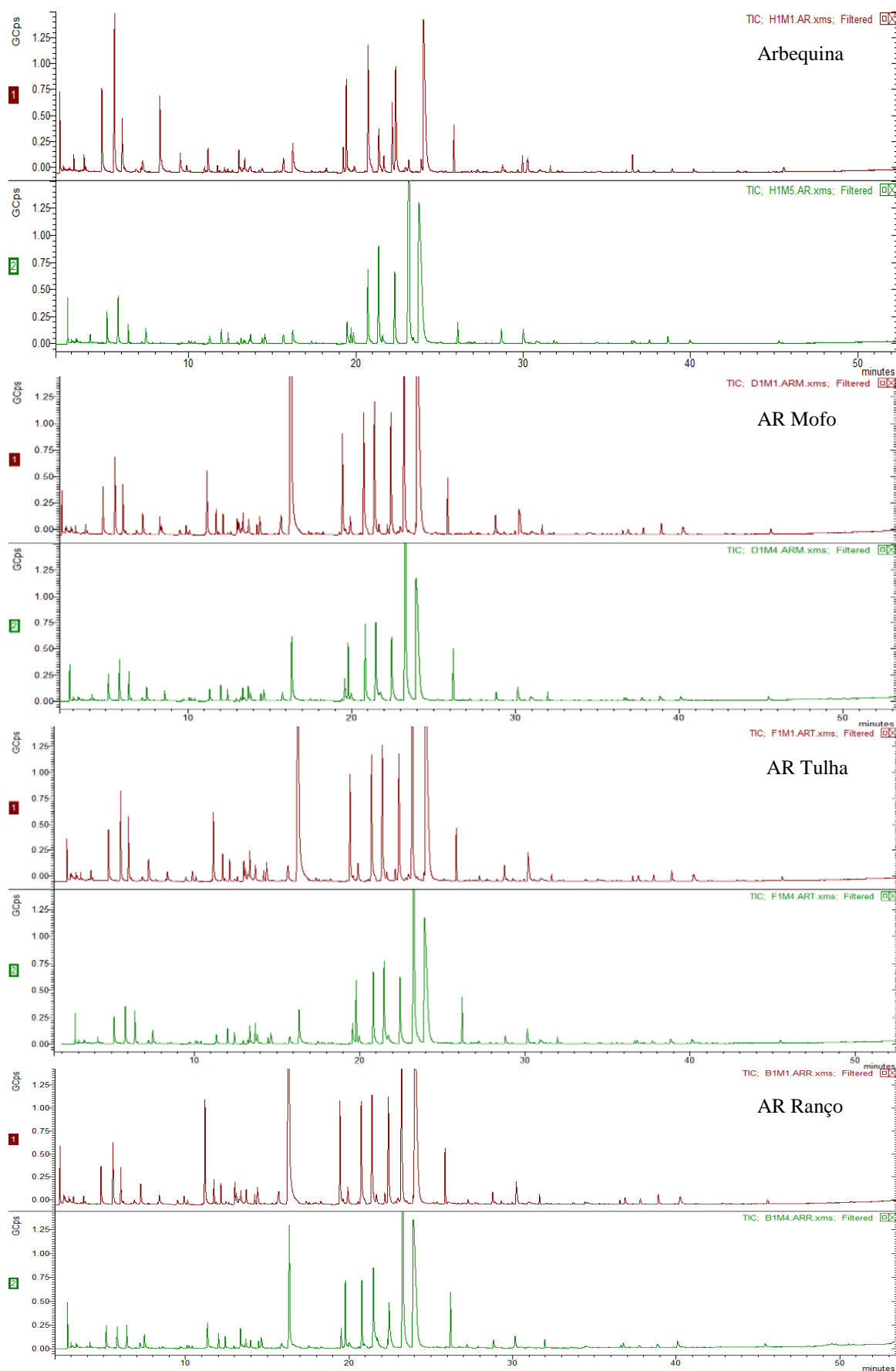


Figura 13. Cromatogramas das amostras no início e no mês em que o defeito foi detetado pelo painel sensorial da VG para a variedade Arbequina, Arbequina com defeito mofo, tulha e ranço respetivamente.

3.3. Identificação dos compostos nas amostras em estudo

O azeite é uma matriz muito complexa com elevada concentração em compostos voláteis com diferentes propriedades físico-químicas, como a volatilidade e a polaridade. A técnica de micro extração em fase sólida (SPME) utilizada permitiu isolar e identificar tentativamente cerca de 400 compostos voláteis e semi voláteis, evidenciando esta extrema complexidade do aroma do azeite. Para a identificação dos compostos, recorreu-se aos espectros de massa e comparou-se com os espectros de referência da biblioteca NIST. Também se calcularam os índices de retenção lineares (LRI) para ajudar nesta identificação, permitindo uma comparação com a literatura.

Identificaram-se hidrocarbonetos, aldeídos, álcoois, cetonas, ácidos carboxílicos, ésteres, entre outros. A maioria destes compostos estão relacionados com as propriedades organoléticas do azeite, tendo características sensoriais que contribuem para as sensações do sabor e do odor – *flavour*, e sendo bastante conhecidas na literatura.

Para a separação destes compostos em SPME foi utilizado um sistema de duas colunas acopladas, uma coluna capilar polar (ZB-WAX) seguida de uma coluna capilar apolar (ZB-5). A utilização de duas colunas acopladas foi de extrema importância, enquanto que a coluna polar isolou a grande variedade dos compostos em função da sua polaridade e volatilidade, a coluna apolar permitiu separar os compostos que apresentaram coeluições na análise com a coluna polar, através das suas temperaturas de ebulição. Além disto a utilização destas duas colunas acopladas associadas a espectrometria de massa permitiu confirmar a identificação de vários compostos, para além de melhorar significativamente a resolução de vários compostos.

Os dados fornecidos pelos espectros de massa foram de elevada relevância na identificação e no estudo das informações estruturais dos compostos, uma vez que estes permitiam observar os padrões de fragmentação e na maioria das vezes permitiam visualizar a presença do íão molecular o que facilitava a identificação. Estes espectros foram sempre comparados aos espectros de referência da biblioteca NIST (*National Institute for Standard Technology*) e aos já descritos na literatura.

No entanto, houve alguma dificuldade na identificação de alguns compostos, devido sobretudo a casos de compostos presentes em concentrações vestigiais e a casos de coeluição, que não obstante a utilização de duas colunas, não foi completamente mitigada.

A maioria dos compostos identificados estão referidos na literatura como compostos constituintes do azeite.

A análise dos cromatogramas das amostras permite verificar que a maior parte dos compostos são comuns a todas as amostras das duas variedades com os diferentes defeitos, estando presentes em proporções relativas diferentes.

3.4. Análise por Componente Principal

Após a constatação da existência de cerca de 400 compostos nas amostras foi necessário conhecer quais os compostos que contribuem para a diferenciação entre estas ao longo do seu armazenamento.

Recorreu-se à PCA, uma análise quimiométrica, para verificar se a alteração das quantidades dos compostos identificados permite distinguir as amostras ao longo do tempo e associá-los aos atributos em estudo. Esta análise reconhece padrões e é aplicada para explorar a variância estatística a fim de aglomerar os perfis que são semelhantes.

Com esta análise estatística pretendeu-se também reduzir o número de compostos (as variáveis) sem afetar a discriminação entre amostras. Apesar de se saber que a maior parte dos compostos são comuns em todas amostras, sabe-se que a quantidade destes depende de vários fatores, e muitos estão associados a atributos positivos ou negativos do azeite [81].

Para submeter as amostras a esta análise foram retiradas as áreas relativas de cada composto presente no perfil cromatográfico. Uma vez que todas as amostras foram injetadas em triplicado foi feita uma média das áreas relativas. Após isto construíram-se matrizes onde as áreas relativas de cada composto formavam as variáveis e as amostras os objetos. Os dados foram submetidos à PCA no programa informático *The Unscrambler X version 10.5*.

Foram consideradas a 1ª e a 2ª componente principal, PC1 e PC2, para todas as amostras pois eram estas que retinham a informação mais representativa (acima de 70% da variância total do sistema), uma vez que representavam uma separação entre as amostras ao longo do tempo de armazenamento.

Aplicou-se a PCA às duas amostras estudadas, Comunitário, Figura 14, e Arbequina, Figura 15, e a cada uma destas com os defeitos aditivados, indicando com linha encarnada o mês em que o defeito foi assinalado pelo painel sensorial e com linha amarela o mês em que parte do painel indicou defeito mas sem concordância. Está presente linha encarnada ou laranja no gráfico respetivamente, caso o defeito tenha sido encontrado, de acordo com a Tabela 5.

CO – Comunitário

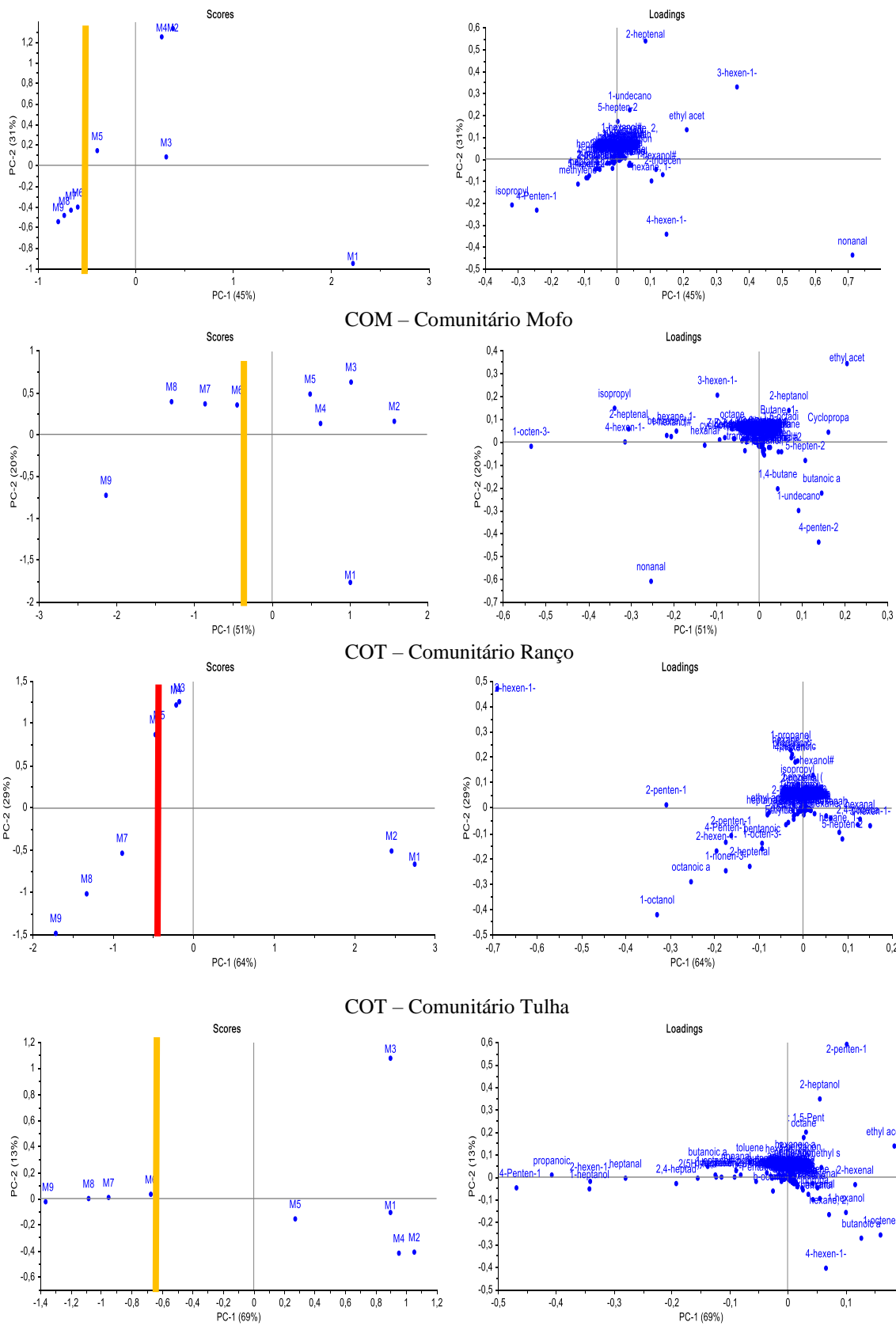


Figura 14. PCA obtidas para as 4 amostras de Comunitário e respectivos defeitos aditivados com a indicação do mês em que o defeito foi encontrado por consenso.

Uma visualização geral da PCA mostrou que dos cerca de 400 compostos identificados, são poucos os que se afastam da origem, considerando estes os responsáveis pelos atributos ao longo do tempo de armazenamento. Também se verificou ser possível visualizar a separação entre os diferentes meses ao longo da PC1.

Na análise estatística da amostra Comunitário, a PC1 explica 45% da variância total e a PC2 31%. A classificação organolética desta amostra pelo painel sensorial não é consensual, ao fim de 240 dias (mês 6) só parte do painel indicou a presença de defeito, e pela PC1 é possível visualizar que os compostos que influenciam ao fim de 240 dias são três álcoois, o isopropanol, o 4-penten-1-ol e o 4-hexen-1-ol, e um aldeído, o 2-heptenal.

A amostra Comunitário aditivada com o defeito mofo quando submetida a análise organolética, ao fim de 240 dias foi detetada com defeito por parte do painel sensorial. E na PCA observamos que os compostos que caracterizam a amostra a partir do mês 6 são o hexanal, o nonanal, o 2-heptenal, o isopropanol, o 1-octen-3-ol, o 3-hexen-1-ol e o 4-hexen-1-ol.

A amostra Comunitário com defeito ranço foi desclassificada pelo painel sensorial ao fim de 240 dias de armazenamento. Os compostos responsáveis pela discriminação dos meses posteriores ao mês 6 são o octanol, o 1-octen-3-ol, o 2-penten-1-ol, o 2-hexen-1-ol e o ácido octanóico.

A amostra aditivada com defeito tulha apresentou defeito ao fim de 240 dias para parte do painel mas sem consenso, pela análise da PCA verificou-se que os compostos responsáveis pelo desvio no eixo da PC1 são o heptanal, o heptanol, o 2-hexen-1-ol, o 4-penten-1-ol e o ácido propanóico.

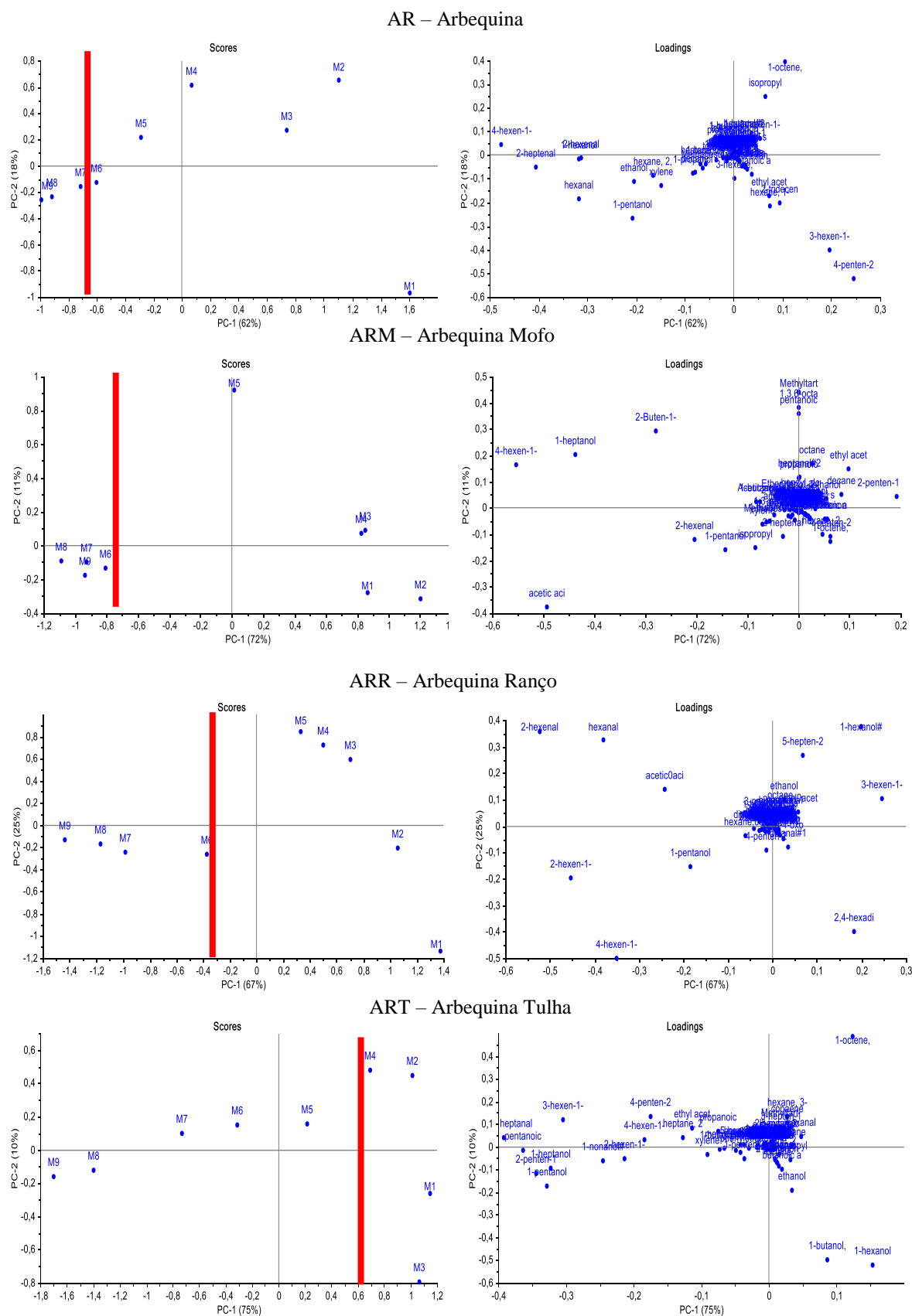


Figura 15. PCA obtidas para as 4 amostras de Arbequina e respectivos defeitos aditivados com a indicação do mês em que o defeito foi encontrado por consenso.

Tal como para as amostras Comunitário também a PCA das amostras Arbequina nos permitiu visualizar que dos cerca de 400 compostos identificados, só alguns se afastam da origem. Também se constatou que é a PC1 que diferencia as amostras ao longo do tempo de armazenamento.

A amostra Arbequina foi detetada com defeito por parte do painel sensorial ao fim de 180 dias mas a desclassificação consensual da amostra deu-se aos 300 dias de armazenamento. Para esta amostra vê-se que os compostos que se distinguem em função do tempo são o hexanal, o 2-heptenal, o 2-hexenal, o pentanol, o hexanol e o 4-hexen-1-ol.

Ao fim de 120 dias a amostra Arbequina aditivada com o defeito mofo foi desclassificada pelo painel sensorial, e pela PCA consegue-se ter percepção que os compostos que influenciam a PC1 são o heptanol, o 2-buten-1-ol, o 4-hexen-1-ol e o ácido acético.

Após avaliação organolética no mês 4, a amostra Arbequina com defeito ranço foi desclassificada pelo painel sensorial. Os compostos que influenciam a PC1 são o hexanal, o 2-hexenal, o pentanol, o 2-hexen-1-ol, o 4-hexen-1-ol e o ácido acético.

Também a amostra Arbequina aditivada com defeito tulha foi desclassificada ao fim de 120 dias. E os compostos que permitem a discriminação a partir do mês 4 são o heptanal, o pentanol, o heptanol, o nonanol, o 2-penten-1-ol, o 2-hexen-1-ol, o 3-hexen-1-ol, o 4-penten-1-ol, o 4-hexen-1-ol e o ácido pentanóico.

3.5. Identificação dos compostos indicadores de defeito

Das PCAs obtidas, resultam um conjunto de compostos que assinalam sensorialmente o aparecimento de defeito, sendo por isso compostos marcadores precoces para o aparecimento do defeito. De um total de cerca de 400 compostos, resultam 22 que caracterizam as amostras com defeito, Tabela 6.

Compostos	CO	COM	COR	COT	AR	ARM	ARR	ART
Hexanal		✓			✓		✓	
Heptanal				✓				✓
Nonanal		✓						
2-heptenal	✓	✓			✓			
2-hexenal					✓		✓	
Pentanol					✓		✓	✓
Hexanol					✓			
Heptanol				✓		✓		✓
Octanol			✓					
Nonanol								✓
Isopropanol	✓	✓						
1-octen-3-ol		✓	✓					
2-buten-1-ol						✓		
2-penten-1-ol			✓					✓
2-hexen-1-ol			✓	✓			✓	✓
3-hexen-1-ol		✓						✓
4-penten-1-ol	✓			✓				✓
4-hexen-1-ol	✓	✓			✓	✓	✓	✓
Ácido acético						✓	✓	
Ácido propanóico				✓				
Ácido pentanóico								✓
Ácido octanóico			✓					

Tabela 6. Compostos que assinalam o aparecimento do defeito.

Seria expectável que os compostos que assinalam o aparecimento de um determinado defeito num tipo de amostra fossem os mesmos que assinalassem o mesmo defeito numa amostra diferente, por exemplo o heptanal é indicador de defeito para o azeite Comunitário dopado com tulha e para o azeite Arbequina dopado com o mesmo defeito, no entanto isto não acontece para todos os compostos. O que leva a crer que os compostos responsáveis por determinados defeitos variam conforme o tipo de amostra. Aparentemente existe uma relação sinérgica entre compostos que resulta sensorialmente, de forma diferente em função de cada variedade de azeite. Assim, é necessário estudar a variedade de azeite antes de verificar quais os compostos responsáveis pelo atributo defeito.

Estes compostos têm diferentes percepções quando em quantidades diferentes [82-83], Tabela 7.

Compostos	Percepção olfativa [82-83]
Hexanal	Frutado, verde, cítrico, maçã, doce, folha, fresco, gorduroso, lenhoso
Heptanal	Fresco, verde, aldeídico, erva, conhaque, avinhado, gorduroso
Nonanal	Fresco, verde, cítrico, gorduroso, pepino
2-hexenal	Verde, banana, queijo, amêndoas amargas, fresco, folha, frutado, erva, picante
2-heptenal	Verde, fresco, doce, frutado, pele de maçã, legume, gorduroso, pungente
Pentanol	Doce, balsâmico, oleoso, pungente, fermentado, avinagrado
Hexanol	Frutado, doce, verde, oleoso, pungente
Heptanol	Frutado, erva, doce, maçã, folha, pungente, mofo, lenhoso
Octanol	Verde, laranja, rosa, côco, cera, cogumelo
Nonanol	Fresco, doce, floral, cítrico, rosa, laranja, gordura, poeira, húmido
Isopropanol	Álcool, mofo, lenhoso
1-octen-3-ol	Erva, mofo, terra, cogumelo
2-buten-1-ol	-
2-penten-1-ol	Verde, frutado, plástico, etéreo, rabanete, mostarda
2-hexen-1-ol	Doce, frutado, verde, folha, gorduroso,
3-hexen-1-ol	Fresco, verde, folha, legume, erva, oleoso, pungente, cru
4-penten-1-ol	-
4-hexen-1-ol	Verde, erva, mofo, tomate, metálico, fresco, legume
Ácido acético	Avinagrado, ácido, pungente, azedo
Ácido propanoico	Pungente, ácido, queijo, vinagre, tulha
Ácido pentanóico	Doce, ácido, queijo, ranço
Ácido octanóico	Gordura, cera, legume, queijo, sabão, ranço

Tabela 7. Percepção olfativa dos compostos que assinalam o aparecimento de defeito [82-83].

Esta identificação de compostos permite verificar que estes estão presentes em todas as amostras, mas em quantidades diferentes, estes provêm de mecanismos de biossíntese comuns devido à presença de enzimas comuns. Como é o caso dos aldeídos e dos álcoois com 6 átomos de carbono, que provêm da oxidação enzimática dos ácidos linolénico e linoleico, Figura 7.

3.5.1. Aldeídos

Foram identificados como compostos que assinalam defeito, 5 aldeídos, o hexanal, o 2-hexenal, o heptanal, o 2-heptenal e o nonanal.

Os aldeídos são uns dos compostos considerados principais para a presença de aroma no azeite. Estes encontravam-se em todas as amostras, em pequenas ou grandes concentrações, Figura 17.

O hexanal no azeite provêm essencialmente da oxidação enzimática do ácido linoleico, Figura 7.

Segundo a literatura o hexanal está associado a percepções olfativas agradáveis, sendo responsável por atributos como frutado, doce, verde e cítrico [84-85]. No entanto, quando em excesso provoca percepções desagradáveis e indesejáveis como ranço/lenhoso [82-83, 86-87]. Uma vez que este para além de surgir pela oxidação enzimática também pode resultar da fotoxidação responsável pelo defeito ranço do azeite [88].

Também o 2-hexenal foi assinalado como composto indicador de defeito, este provém da oxidação enzimática do ácido linolénico, normalmente associado a um aroma agradável a ervas frescas sendo responsável pela notas verdes e frutadas, no entanto em concentrações elevadas pode levar a um flavour a amêndoas amargas [89-92].

Já o heptanal e o nonanal, são provenientes de reações de decomposição de hidroperóxidos formados pela auto oxidação do ácido oleico, e são responsáveis por agradáveis notas olfativas verdes, frescas e picante, mas em outras quantidades podem ser responsáveis pelos sabores avinhado e gorduroso [71-72].

Além destes, encontramos também o 2-heptenal, que deve a sua formação a um mecanismo que se inicia como o 9-hidroperóxido do ácido linoleico, envolvendo uma β -cisão e degradações sucessivas do radical dieno [89, 93]. Este composto é responsável pelo odor pungente.

A identificação dos compostos foi feita com base no tempo de retenção dos picos e nos espetros de massa obtidos, no entanto devido à grande complexidade das amostras foram geradas muitas dúvidas. A solução passaria pela injeção de padrões autênticos mas a compra de todos os padrões não é viável tanto economicamente como temporalmente.

Os índices de retenção são importantes para a identificação dos compostos pois permitem serem comparados com a literatura, assim foi necessário injetar uma série homóloga de hidrocarbonetos nas mesmas condições experimentais que as amostras, Figura 16.

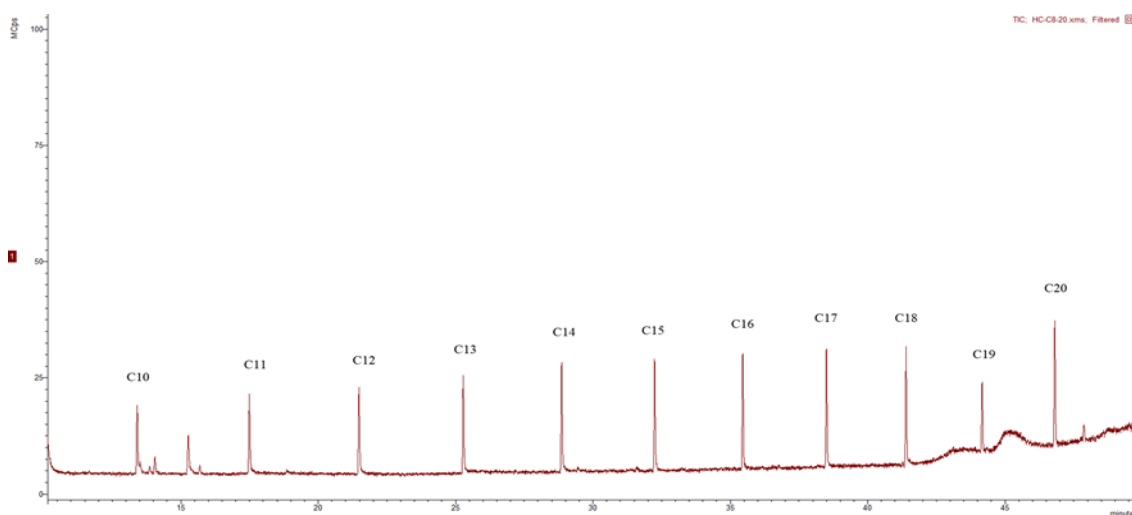


Figura 16. Cromatograma da série homóloga de hidrocarbonetos.

Os índices de retenção lineares são uma ferramenta importante para mitigar problemas de identificação de compostos na cromatografia convencional.

Para a identificação é necessário fazer uma monitorização das séries dos compostos (por extração de ião), uma vez que compostos homólogos eluem em intervalos de tempo de retenção iguais entre si.

Para a identificação monitorizaram-se os aldeídos através da extração de ião, Figuras 17 e 18, e recorreu-se aos espectros de massa para comparar com os espectros de referência da biblioteca NIST, Figura 20.

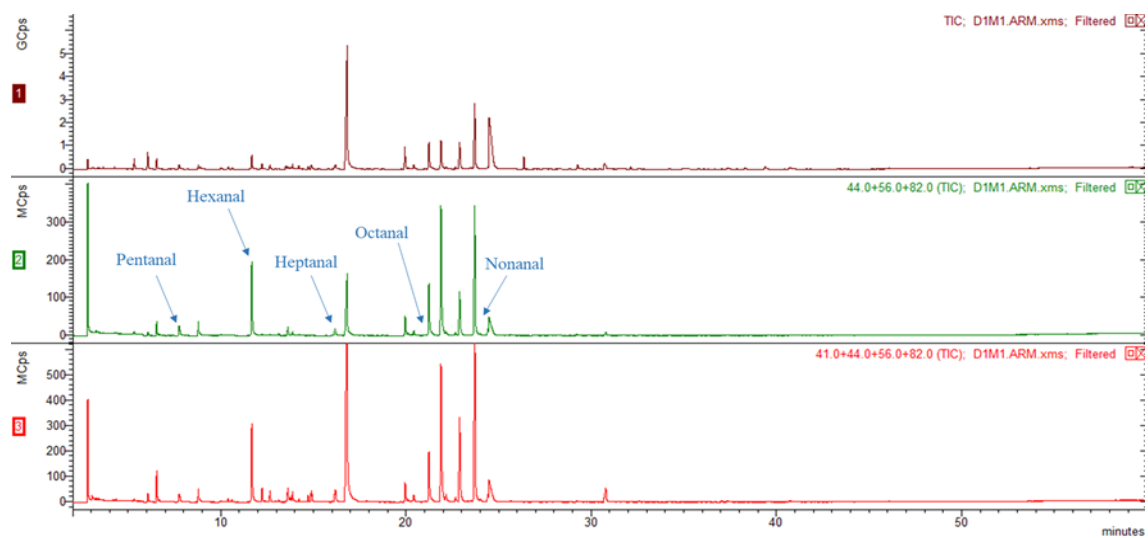


Figura 17. Monitorização dos aldeídos através da extração de ião ($m/z = 41, 44, 56$ e 82).

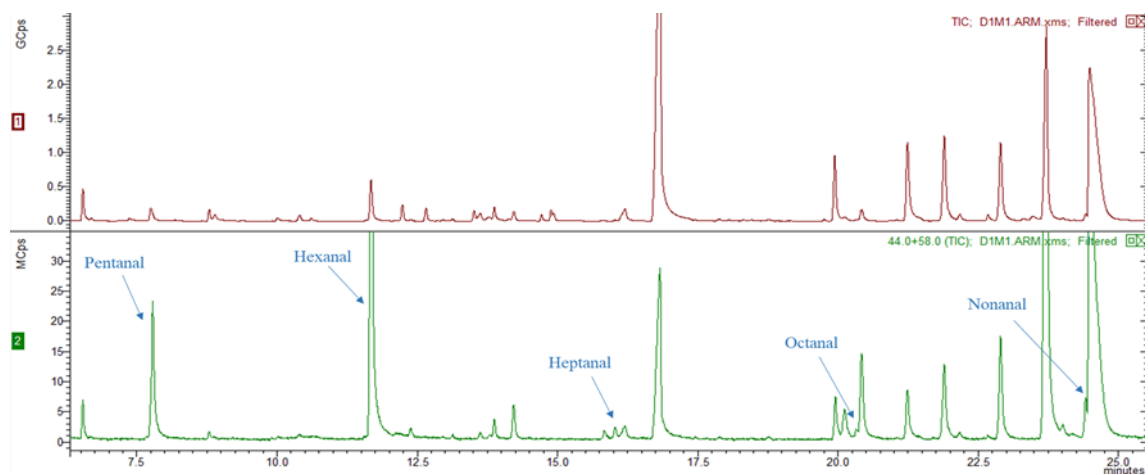


Figura 18. Amplificação do tempo de retenção de 7,5 minutos a 25 minutos para a monitorização dos aldeídos.

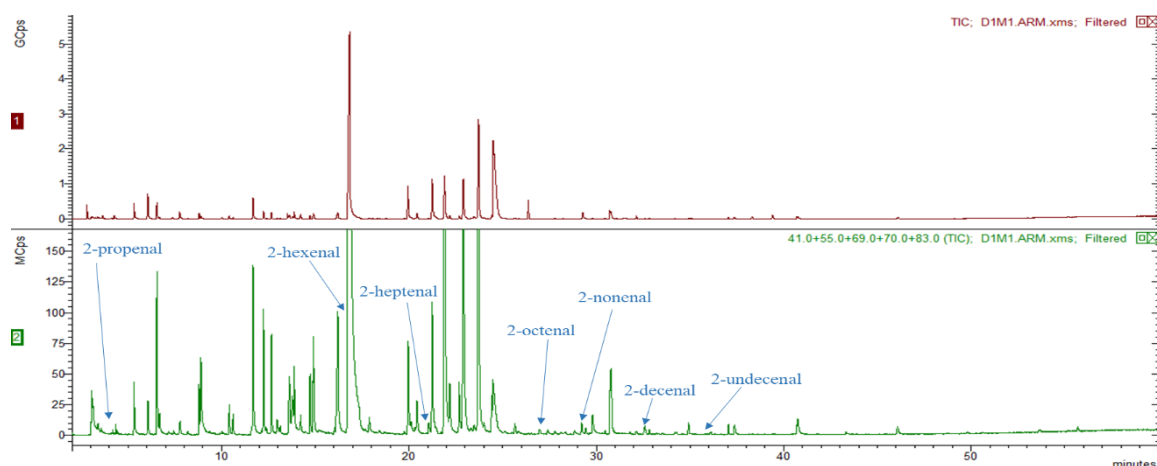


Figura 19. Monitorização dos aldeídos na posição 2 através da extração de ião ($m/z = 41, 55, 69, 70$ e 83).

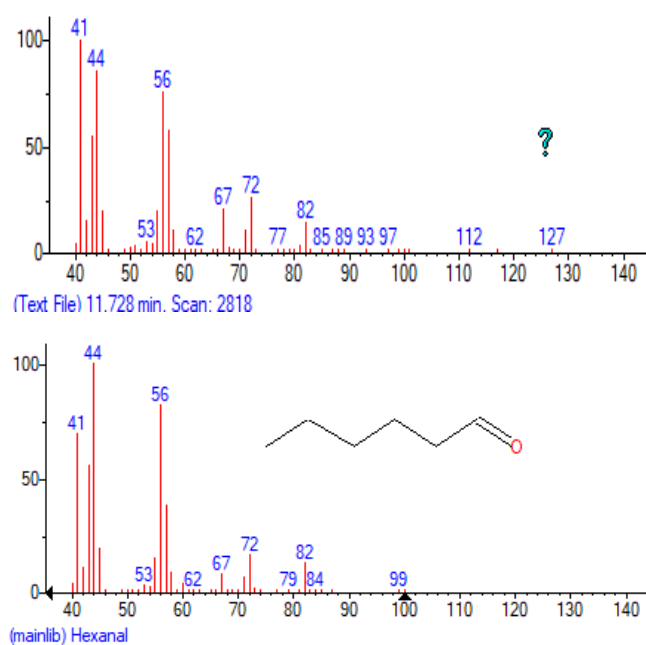


Figura 20. Comparação do espectro de massa do hexanal com o da biblioteca NIST.

Calculou-se o índice de retenção linear para cada composto, o que permitiu assegurar a presença de cada um deles por comparação com a literatura [96-114], Tabela 8.

Compostos	Tempo de retenção (minutos)	m/z	LRI experimental	LRI literatura [96-114]
Pentanal	7,794	M⁺86(3%) ; 44(100%); 41(60%); 58(55%)	837	[896-1002]
Hexanal	11,728	M⁺100(0,2%) ; 41(100%); 44(85%); 56(75%)	951	[851-1080]
Heptanal	16,028	M⁺114(1%) ; 41(100%); 44(87%); 55(82%)	1064	[1126-1197]
2-hexenal	16,827	M⁺98(10%) ; 41(100%); 55(89%); 69(70%)	1084	[1160-1225]
Octanal	20,326	M⁺128(0,05%) ; 41(100%); 43(93%); 57(71%)	1171	[1231-1307]
2-heptenal	21,048	M⁺112(5%) ; 41(100%); 83(85%); 55(80%)	1189	[1320-1336]
Nonanal	24,416	M⁺142(0,75%) ; 57(100%); 41(97%); 43(53%)	1277	[1394-1415]
2-octenal	27,051	M⁺126(1%) ; 55(100%); 83(75%); 70(60%)	1349	[1432-1442]
2-nonenal	29,212	M⁺140(0,3%) ; 41(100%); 55(88%); 70 (75%)	1410	[1510-1561]
2-decenal	32,577	M⁺154(0,6%) ; 41(100%); 55(95%); 70(90%)	1510	[1590-1652]
2-undecenal	35,989	M⁺168(5%) , 41(100%); 70(90%); 55(80%)	1618	[1758-1761]

Tabela 8. Monitorização dos aldeídos, tempo de retenção, relação massa/carga e índices de retenção lineares.

Os índices de retenção lineares experimentais para cada composto são inferiores aos encontrados na literatura [96-114]. Considerando que se utilizou um sistema de duas colunas acopladas, polar-apolar, o facto da 2ª coluna ser apolar diminui o valor de LRI para cada composto. No entanto, estes valores estão de acordo com as janelas de probabilidade para um sistema de acoplamento de colunas descritas na literatura [94].

3.5.2. Álcoois

Tal como os aldeídos, também os álcoois estão presentes em grande quantidade e variedade nas amostras estudadas, constituindo assim outra classe importante no aroma do azeite.

Foram identificados diversos álcoois nas nossas amostras e foram estes os mais assinalados como compostos que atribuem defeito. Entre estes, estão os álcoois provenientes da via da lipoxigenase, o hexanol, o hex-2-en-1-ol e o hex-3-en-1-ol [71-72]. Normalmente estes compostos estão associados a notas olfativas agradáveis, no entanto podem surgir notas desagradáveis quando estão em concentrações diferentes.

Os outros álcoois encontrados são provenientes de fermentações, de degradações aminoácidos ou de hidratos de carbono.

Os álcoois foram monitorizados pela extração de ião, Figura 21.

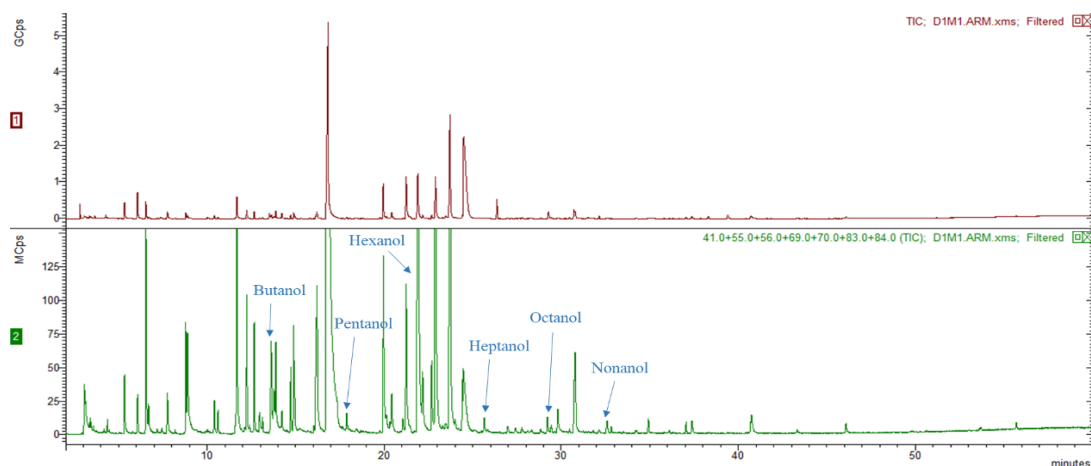


Figura 21. Monitorização dos álcoois através da extração de ião ($m/z = 41, 55, 56, 69, 70, 83$ e 84).

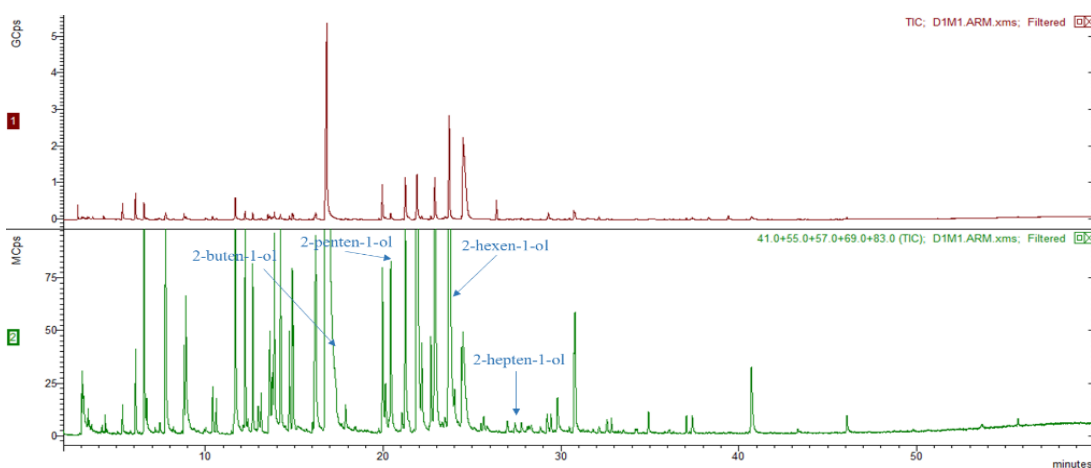


Figura 22. Monitorização de álcoois através da extração de ião ($m/z = 41, 55, 57, 69$ e 83).

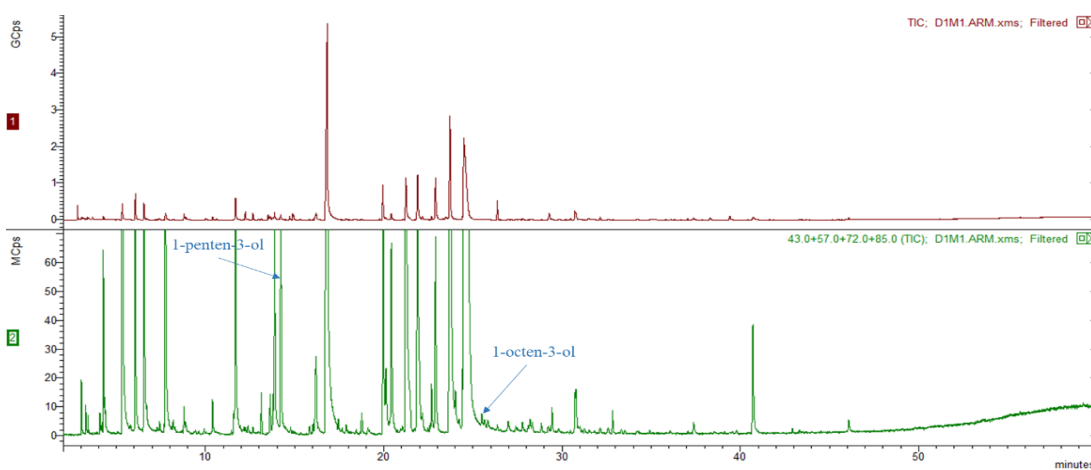


Figura 23. Monitorização de álcoois através da extração de ião ($m/z = 43, 57, 72$ e 85).

Para estas identificações, recorreu-se à identificação seletiva dos iões diagnóstico por comparação com a biblioteca NIST, Figura 24.

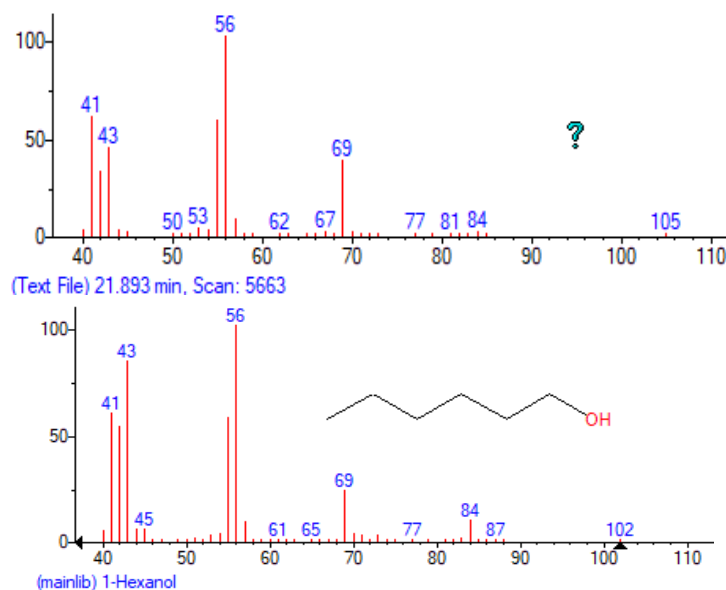


Figura 24. Comparação do espectro de massa do hexanol com o da biblioteca NIST.

Posteriormente calcularam-se os índices de retenção para ser possível uma comparação com a literatura de modo a assegurar a correta monitorização [96-114].

Compostos	Tempo de retenção (minutos)	m/z	LRI experimental	LRI Literatura [96-114]
Butanol	13,622	M⁺74(0,3%) ; 41(100%); 56(65%); 43(36%)	1005	[1074-1147]
1-penten-3-ol	14,223	M⁺86(0,5%) ; 57(100%); 41(74%); 43(60%)	1020	[1093-1176]
2-buten-1-ol	17,444	M⁺72(1%) ; 43(100%); 41(58%); 57(41%)	1099	-
Pentanol	17,875	M⁺88(0,4%) ; 55(100%); 42(90%); 41(72%)	1110	[1184-1256]
2-penten-1-ol	20,427	M⁺86(3%) ; 57(100%); 41(30%); 44(20%)	1174	[1250-1320]
Hexanol	21,893	M⁺102(0,025%) ; 56(100%); 41(60%); 55(58%)	1211	[1351-1392]
2-hexen-1-ol	23,714	M⁺100(1%) ; 57(100%); 41(45%); 67(27%)	1259	[1348-1417]
1-octen-3-ol	25,485	M⁺128(0,5%) ; 57(100%); 40(66%); 72(20%)	1306	[1438-1465]
Heptanol	25,645	M⁺116(4%) ; 55(100%); 56(93%); 43(93%)	1310	[1400-1460]
2-hepten-1-ol	27,405	M⁺168(0,07%) ; 57(100%); 41(55%); 55(45%)	1359	-
Octanol	29,222	M⁺130(0,75%) ; 41(100%); 56(97%); 55(82%)	1411	[1504-1566]
Nonanol	32,587	M⁺144(1%) ; 55(100%); 56(93%); 41(92%)	1511	[1628-1658]

Tabela 9. Monitorização dos álcoois, tempo de retenção, relação massa/carga e índices de retenção lineares.

3.5.3. Ácidos Carboxílicos

Nas amostras estudadas foram detetados vários ácidos carboxílicos saturados lineares, Figura 18, no entanto só 4 deles foram assinalados com composto indicador de defeito, o ácido acético, o ácido prapanóico, o ácido pentanóico e o ácido octanóico.

A presença do ácido acético e do ácido propanoico deve-se provavelmente à atividade de microrganismos como bactérias e fungos, pela fermentação do azeite [95].

Já o ácido octanóico provém da oxidação do seu aldeído correspondente [88].

Os ácidos carboxílicos foram localizados pela monitorização seletiva do ião diagnóstico $m/z=60$, recorrendo à NIST para ajudar na identificação destes.

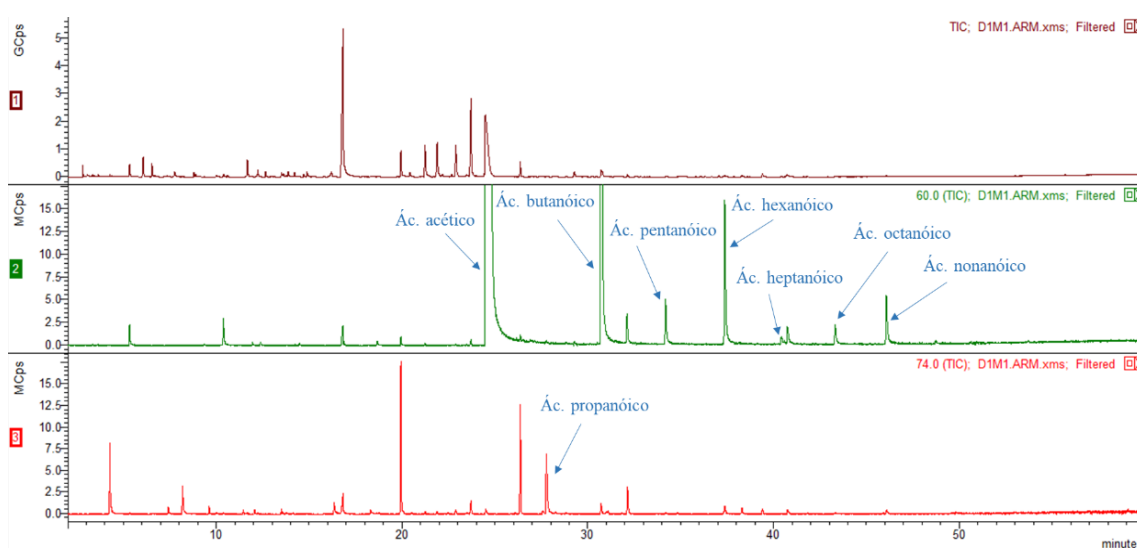


Figura 25. Monitorização dos ácidos carboxílicos através da extração de ião.

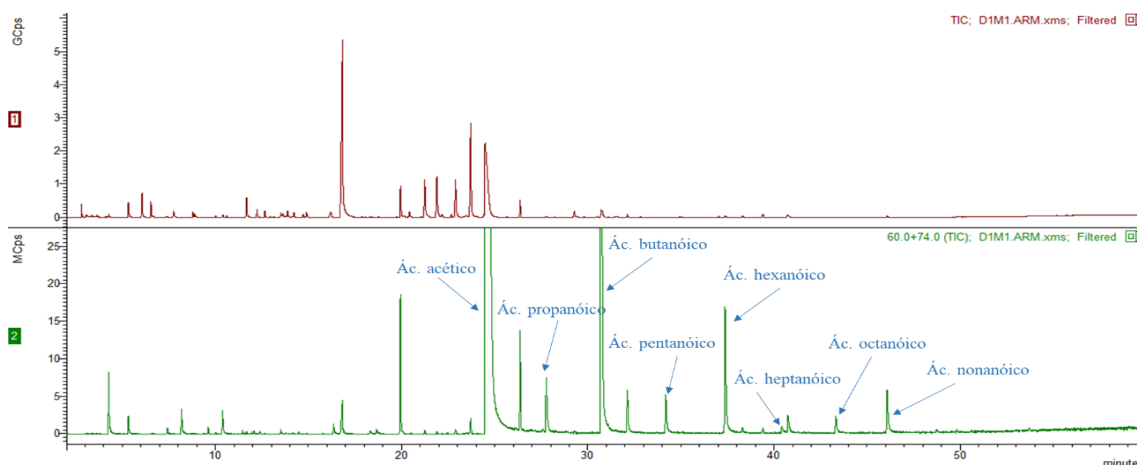


Figura 26. Monitorização dos ácidos carboxílicos através da extração de ião ($m/z = 60$ e 74).

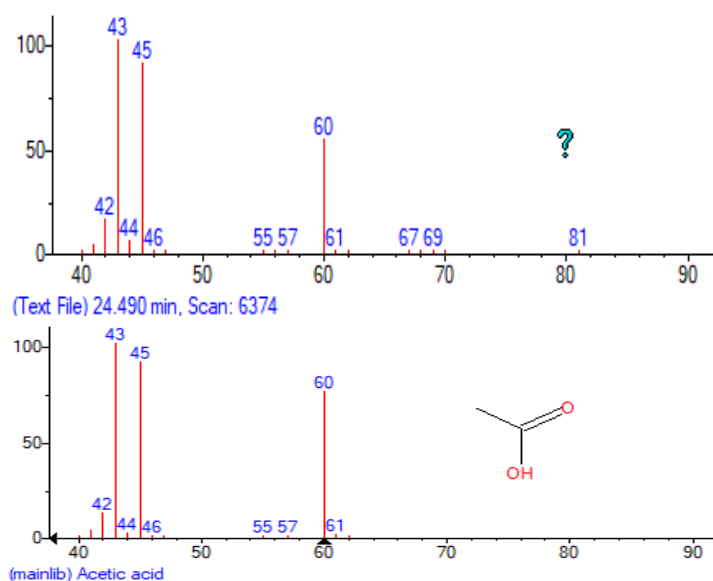


Figura 27. Comparação do espectro de massa do ácido acético com o da biblioteca NIST.

Calcularam-se os índices de retenção e comparou-se com os valores de literatura [96-114], Tabela 10.

Compostos	Tempo de retenção (minutos)	m/z	LRI experimental	LRI Literatura [96-114]
Ác. acético	24,490	M⁺60(53%) ; 43(100%); 45(88%); 42(16%)	1279	[1434-1480]
Ác. propanóico	27,770	M⁺74(100%) ; 73(95%); 45(88%); 57(35%)	1370	[1495-1554]
Ác. butanóico	30,721	M⁺88(1%) ; 60(100%); 73(35%); 41(25%)	1455	[1588-1650]
Ác. pentanóico	34,189	M⁺102(0,15%) ; 60(100%); 73(36%); 55(19%)	1561	[1700-1746]
Ác. hexanóico	37,381	M⁺116(0,15%) ; 60(100%); 73(50%); 41(27%)	1663	[1863-1872]
Ác. heptanóico	40,419	M⁺130(10%) ; 73(100%); 60(85%); 41(41%)	1766	[1900-1962]
Ác. octanóico	43,323	M⁺144(0,25%) ; 60(100%); 73(60%); 41(45%)	1869	[2083-2098]
Ác. nonanóico	46,083	M⁺158(1%) ; 107(100%); 60(63%); 73(56%)	1972	[2198-2202]

Tabela 10. Monitorização dos ácidos carboxílicos, tempo de retenção, relação massa/carga e índices de retenção lineares.

Capítulo 4. Conclusões e Perspetivas Futuras

4. Conclusões e Perspetivas Futuras

Na matriz azeite estudada no âmbito deste trabalho foram identificados cerca de 400 compostos. O perfil volátil das amostras mostrou ser bastante complexo, apresentando variadas diferenças em função da amostra estudada.

Para a extração dos compostos do aroma do azeite foi utilizada a técnica HS-SPME-GC/MS.

Após a monitorização e controlo organolético pela Victor Guedes, foram identificados por PCA os 22 compostos potencialmente marcadores de defeito que podem permitir estimar, precocemente, o tempo de vida útil de um azeite armazenado.

Verificou-se que as amostras de azeite Comunitário (mistura de variedades) parecem demonstrar maior resistência ao aparecimento de defeito relativamente à variedade Arbequina. Após 480 dias não foi obtida unanimidade do painel sensorial da VG, à exceção do azeite Comunitário com defeito ranço, que ao fim de 240 dias já possuía concordância no painel quanto ao seu defeito.

Também se verificou que o mesmo defeito em diferentes tipos de amostra não pode ser atribuído aos mesmos compostos, sendo necessário estudar previamente o perfil da amostra.

É importante continuar a avaliar o perfil cromatográfico, e introduzir novas amostras, misturas da variedade Arbequina com Comunitário, em diferentes percentagens.

Assim, é objetivo futuro estabelecer diagramas de correlação composto/proporção relativa/atributo de modo a estimar o período de validade de um azeite após armazenamento.

Capítulo 5. Referências Bibliográficas

5. Referências Bibliográficas

- [1] Lidon, F.J.; Silvestre, M.M.; "Indústrias Alimentares - Aditivos e Tecnologia"; Escolar Editora; 2007; 49-53; 143; 144; 252-259
- [2] Chatzilazarou, A.; Gortzi, O.; Lalas, S.; Zoidis, E.; Tsaknis, J.; "Physicochemical changes of Olive Oil and selected vegetable oils during frying"; Journal of Food Lipids; 2006; 13; 27-35
- [3] Castro Caldas, E.; "A Agricultura na História de Portugal"; Empresa de Publicações Nacionais, Lda; Lisboa; 1998
- [4] COI, Conselho Oleícola Internacional - <http://www.internationaloliveoil.org/> acedido em Agosto de 2017
- [5] Monteiro, M.; "A Oliveira"; João Azevedo Editor; Mirandela; 1999
- [6] Kandyli P.; Vekiari A.S.; Kanellaki M.; Kamoun N.G.; Msallem M.; Kourkoutas Y.; "Comparative study of extra virgin olive oil flavor profile of Koroneiki variety (*Olea europaea* var. *Microcarpa alba*) cultivated in Greece and Tunisia during one period of harvesting"; Food Science and Technology; 2011; 44; 1333-1341.
- [7] Carrasco Pancorbo, et. al; "Rapid Quantification of the Phenolic Fraction of Spanish Virgin Olive Oils by Capillary Electrophoresis with UV Detection"; J. Agric. Food Chem.; 2006; 54; 7984-7991
- [8] Huang, L; Bauer S.; "Olive Oil, the Mediterranean Diet, and Cardiovascular Health"; American College of Surgeons; 2008; 407-416
- [9] Willet, W.C., et al.; "Mediterranean diet pyramid: a cultural model for healthy eating"; Am. J. Clin. Nutr.; 1995; 61; 1402
- [10] Tuck, K; Hayball, P.; "Major phenolic compounds in olive oil: metabolism and health effects"; Nutritional Biochemistry; 2002; 13; 636-644
- [11] Gallo - <https://www.gallooliveoil.com/pt.aspx> acedido em Agosto de 2017
- [12] Mensink, R. P.; Katan, M. B.; "Effect of Dietary Trans Fatty Acids on High-Density and Low-Density Lipoprotein Cholesterol Levels in Healthy Subjects"; The New England Journal of Medicine; 1989; 323; 439-445
- [13] March, L.; Ríos, A.; "El Libro del Aceite y la Aceituna"; Alianza Editorial, S. A; 1989
- [14] Peres, E.; "Comportamento Alimentar"; Porto; 1994; 1; 7-8
- [15] Bretillon, L.; Chardigny, J.M.; Noel, J.P.; Sebedio, J.L.; "Desaturation and chain elongation of [1-14C] mono-trans isomers of linoleic and α -linolenic acids in perfused rat liver"; J. Lipid Res.; New York; 1998; 39; 2228-2236
- [16] Casa do Azeite - <http://www.casadoazeite.pt/> acedido em Agosto de 2017
- [17] CONFAGRI, Confederação Nacional das Cooperativas Agrícolas e do Crédito Agrícola de Portugal - <http://www.confagri.pt> acedido em Agosto de 2017

- [18] Gouveia, J.; Saldanha, J.; Martins, A.; Modesto, M; Sobral, V.; “O azeite em Portugal”; Edições Inapa, S.A.; Lisboa; 2002; 155-157
- [19] Regulamento (CEE) nº 2568/91 da Comissão de 11 de Julho de 1991, relativo às características dos azeites e dos óleos de bagaço de azeitona, bem como aos métodos de análise relacionados, Jornal Oficial das Comunidades Europeias, L248, 5 de Setembro de 1991, e suas alterações
- [20] Firestone, D.; “Bailey's industrial oil & fat products”; Olive Oil; Ed. F. Shahidi, USA; 2005; 1; 6
- [21] Gouveia, J.; “IX Curso Internacional sobre a melhoria de Qualidade do Azeite”; Lisboa; 1996
- [22] Gouveia, J.M.B.; “Azeites Virgens do Alto Alentejo – Comportamento Químico, Tecnológico e Sensorial”; Dissertação para obtenção de grau de doutor; Instituto Superior de Agronomia, Lisboa; 1995
- [23] Antolini, P.; “Il Libro dell’Ulivo e dell’Olio d’Oliva”; Casa editrice Marietti S.p.A., Génova; 1986; 46
- [24] Ranalli, A.; Lucera, L.; Contento, S; Simone, N.; Re, P; “Bioactive constituents, flavors and aromas of virgin oils obtained by processing olives with a natural enzyme extract”; Eur. J. Lipid Sci. Technol.; 2004; 106; 187-197
- [25] Sanchez, J.; Carretero, S.; Gutierrez, F.; “Composicion del Aceite de Oliva. Aceite de oliva virgen: nuestro patrimonio alimentário”; Instituto Omega 3. Ed.Puleva, Granada; 2001
- [26] Boskou, D.; “Olive Oil: Chemistry and Technology”; AOCS Press; Flórida; 1996; vol. 41
- [27] Gutiérrez, A; Carretero, A.; “El Aceite de Oliva Virgen: Tesoro de Andalucía”; Fundación Unicaja, Espanha; 2009
- [28] <http://www.viaz.pt> acedido em Agosto de 2017
- [29] Stefanoudaki, E.; Kotsifaki, F.; Koutsaftakis, A.; “The potencial of HPLC triglyceride profiles for the classification of Cretan olive oils”; Food Chemistry; 1997; 60; 425-432
- [30] Gunstone, F.; “Vegetable oils in food technology: Composition, Properties and Uses”; Blackwell Publishing; 2002; 1
- [31] Kiritsakis, A; Christie, W.W.; “Analysis of Edible Oils. In Handbook of Olive Oil – Analysis and properties”; Ed. Harwood J.; Aparicio R.; Aspen Publishers, Inc. Gaithersburg; 2000; 129-158
- [32] Boskou, D.; “Química y Tecnología del Aceite de Oliva”; AMV Ediciones; Madrid; 1998; 67-104; 125-164
- [33] Rice-Evans, C.A.; Miller, N.J.; Paganga, G.; “Antioxidant properties of phenolic compounds”; Trends Plant Sci.; 1997; 2; 152-159
- [34] Heinonen, M.; “Antioxidant activity and antimicrobial effect of berry phenolics – a Finnish perspective Review”; Mol Nutr Food Res; 2007; 51; 684-691
- [35] Servili, M.; Selvaggini, R.; Esposto, S.; Taticchi, A.; Montedoro, G.; Morozzi, G.; “Health and sensory properties of virgin olive oil hydrophilic phenols: agronomic and technological

aspects of production that affect their occurrence in the oil”; J. Chromatogr. A.; 2004; 1054; 113-127

[36] Diez, M.J.G.F.; Adamos, M.R.; “Table Olives”; Chapman & Hall, London (UK); 1997; 67-109

[37] Roncero, A.V.; Costante, E.G.; Durán, R.M.; “Componentes fenólicos de la aceituna, Polifenoles de la pulpa”; Graças y Aceites; 1974; 25; 269-274

[38] Montedoro, G.; Servilli, M.; Baldioli, M.; Miniati, E.; “Simple and hydrolyzable compounds in virgin olive oil - Their extraction, separation and quantitative and semiquantitative evaluation by HPLC”; J. Agric. Food Chem.; 1992; 40; 1571-1576.

[39] Brenes, M.; Garcia, A.; Garcia, P.; Rios, J. J.; Garrido, A.; “Phenolic Compounds in Spanish Olive Oils”; Agric. Food Chem.; 1999; 47; 3535-3540

[40] Montedoro, G.F.; “I costituenti fenólico presenti negli oli vergini de oliva. Notai: identificazione di alcuni acidi fenocili e loro potere antiossidante”; S. T. A3; 1972; 177-186

[41] Roncero, A.V.; “Les polyphenols de l'huile d'olive et leur influence sur les caracteristiques de l'huile”; Rev. Fr. Corps Gras.; 1978; 25; 21-26

[42] Rovelli, P.; Cortesi, N.; Fedeli, E.; “Analysis of flavonóides from Olea europaea by HPLC-UV and HPLC-electrospray-MS; Riv. Ital. Sostanze Crasse; 1997; 74; 273-279

[43] Paiva, F.; “Apontamentos de Química dos Alimentos e Nutrição – Lípidos”

[44] Montedoro, G.; Servilli, M.; “Contribution of phenolic compounds to virgin olive oil quality”; Eur. J. Lipid Sci. Technol.; 2002; 104; 602-613

[45] Perrin, J.L.; “Les Composés Mineurs et les Antioxygènes Naturels de l'Olive et de son Huile”; Revue Française des Corps Gras; 1992; 39; 25-32

[46] Giuffrida, D; Salvo, F; Salvo, A; Pera, L; Dugo, G.; “Pigments composition in monovarietal virgin olive oils from various sicilian olive varieties”; Food Chemistry; 2007; 101; 833-837

[47] Ryan, D.; Robards, K.; Lavee S.; “Evaluación de la calidad del aceite de oliva”; Olivae; Conselho Oleícola Internacional; Madrid; 1998; 72; 23-39

[48] Costa Lobo, A.; “A Ficha da Oliveira” - <http://naturlink.pt/article.aspx?menuid=55&cid=73441&bl=1> acedido em Agosto de 2017

[49] Ayadi, M.; Kamoun, N.; Attia, H.; “Physico-chemical change and heat stability of extra virgin olive oils flavoured by Tunisian aromatic plants”; Food and Chemical toxicology; 2009; 47; 2613-2619

[50] Kalua C.M.; Allen M.S.; Bedgood D.R.; Bishop A.G.; Prenzler P.D.; Robards K.; “Olive oil volatile compounds, flavour development and quality: a critical review”; Food Chemistry 100; 2007; 273-286

[51] Kiritsakis, A.; “Olive oil: From the tree to the table. Second Edition Food and Nutrition Press”; Inc. Trumbull, Connecticut; 1998

[52] Granados, J.A.; “Enciclopedia del Aceite de Oliva, Historia y Leyendas del aceite y la Aceituna”; Editorial Planeta; Barcelona; 2000; 109-114; 357-372

- [53] Kiritsakis, A.K.; “El Aceite de Oliva” A. Madrid Vicente, Ediciones, Madrid; 1992; 45- 76; 77-82; 83-102; 131-156; 157-162; 163-180
- [54] Monguez-Mosquera, et.al; “Color Pigment Correlation in Virgin Olive Oil”; Journal of the American Oil Chemists’ Society 68; 1991; 332-336
- [55] Dekhili, S; Sirieix, L; Cohen, E.; “How consumers choose olive oil: The importance of origin cues”; Food Quality and Preference; 2011; 22; 757-762
- [56] Zanoni, B.; Bertuccioli, M.; Rovellini, P.; Marotta, F.; Mattei, A.; “A preliminar approach to predictive modelling of extra virgin olive oil stability”; J. Sci. Food Agric.; 2005; 85; 1492-1498
- [57] Procida, G.; Giomo, A.; Cichelli, A.; Conte, L.; “Study of volatile compounds of detective virgin olive oils and sensory evaluation: a chemometric approach”; J. Sci Food Agric.; 2005
- [58] Fiorino, P.; “Técnicas Agronómicas e Características do Azeite”; Enciclopédia mundial da Oliveira; 1996; 197-222
- [59] Shahidi, F; Zhong, Y.; “Lipid Oxidation: Measurement Methods, Bailey’s Industrial Oil and Fat Products”; 6ª Edição; 2005; vol. 6
- [60] Paraskevopoulou, D.; Boskou, D.; Paraskevopoulou, A.; “Oxidative stability of olive oil–lemon juice salad dressings stabilized with polysaccharides”; Food Chemistry; 2007; 101; 1197–1204
- [61] Villalta, L.; “Obtención del aceite de oliva virgen”; 2ª Edição, Editorial Agrícola Española, S.A.. Madrid; 1999
- [62] Laguerre, M.; Lecomte, J.; Villeneuve, P.; “Review - Evaluation of the ability of antioxidants to counteract lipid oxidation: Existing methods, new trends and challenges”; Prog Lipid Res.; 2007; 46; 244-282
- [63] Benincasa, C.; De Nino, A.; Lombardo, N.; Perri, E.; Sindona, G. & Tagarelli, A.; “Assay of Aroma Active Components of Virgin Olive Oils from Southern Italian Regions by SPME-GC/Ion Trap Mass Spectrometry”; Journal of Agricultural and Food Chemistry; 2003; 51; 733-741
- [64] McGinley, M.A.; McGinley, C.M.; “Olfactomatics : Applied Mathematics for Odor Testing”; WEF odor / VOC Specialty Conference; Cincinnati; 2000
- [65] Linforth, R.; Martin, F.; Carey, M.; Davidson, J.; Taylor, A.; “Retronasal Transport Of Aroma Compounds”; J. Agric. Food Chem; 2002; 50; 1111-1117
- [66] Touhara, K; “Odor Discrimination By G Protein-Coupled Olfactory Receptors”; Microscopy Research and Technique, 2002, 58, 135-141
- [67] Nibu, K; “Introduction to Olfactory Neuroepithelium; Microscopy Research and Technique”; 2002; 58; 133-144
- [68] Dryer, L.; “Evolution of Odorant Receptors”; Bioessays; 2000; 22; 803-810
- [69] The Nobel Foundation - <https://www.nobelprize.org> acedido em Agosto de 2017
- [70] PowerS, W.; “The Science of Smell Part 1: Odor Perception and Physiological Response”; Iowa State University: University extension; Ames; 2004

- [71] Angerosa, F.; “Influence of volatile compounds on virgin olive oil quality evaluated by analytical approaches and sensor panels”; *European Journal of Lipid Science Technology*; 2002; 104; 639-660
- [72] Angerosa, F.; Servilli, M.; Selvaggini, R.; Taticchi, A.; Espoto, S.; Montedoro, G.; “Volatile Compounds in Virgin Olive Oil: Occurrence and their Relationship with the Quality”; *J. Chromatogr. A*; 2004; 1054, 17-31
- [73] Gutiérrez, F.; Fernández, J.; “Determinant Parameters and Components in the Storage of Virgin Olive Oil. Prediction of Storage Time beyond which the Oil is no Longer of “Extra” Quality”; *J. Agric. Food Chem.*; 2002; 50; 571-577
- [74] Jacobsen, C.; “Sensory impact of lipid oxidation in complex food systems”, *Fett/Lipid*; 1999; 101; 484-492
- [75] Allen J.; “Industrial Aspects of Lipids Oxidation; Recent Advances in Chemistry and Technology of Fats and Oils”, Ed. Hamilton, R.; Bhati, A.; Elsevier Applied Science Publishers Ltd; Londres; 1987; 31-39
- [76] Naz, S.; Siddiqi, R.; Sheikh, H.; Sayeed, S.; “Deterioration of olive, corn, and soybean oils due to air, light, heat and deep-frying”; *Food Research International*; 2005; 38; 127-134
- [77] Dierkes, G.; Bongartz, A.; Guth, H.; Hayen, H.; “Quality Evaluation of Olive Oil by Statistical Analysis of Multicomponent Stable Isotope Dilution Assay Data of Aroma Active Compounds”; *J. Agric. Food Chem.*; 2012; 60; 394-401
- [78] Romero, I.; García-González, D.L.; Aparicio-Ruiz, R.; Morales, M.T.; “Validation of SPME-GCMS method for the analysis of virgin olive oil volatiles responsible for sensory defects”; *Talanta*; 2015; 134; 394-401
- [79] Oliver-Pozo, C.; Aparicio-Ruiz, R.; Romero, I.; García-González, D.; “Analysis of Volatile Markers for Virgin Olive Oil Aroma Defects by SPME-GC/FID: Possible Sources of Incorrect Data”; *J. Agric. Food Chem.*; 2015; 63; 10477-1483
- [80] Pérez, A.G.; Rosa, R.; Pascual, M.; Sánchez-Ortiz, A.; Romero-Segura, C.; León, L.; Sanz, C.; “Assessment of volatile compound profiles and the deduced sensory significance of virgin olive oils from the progeny of Picual x Arbequina cultivars”; *J. Chromatogr. A*; 2016; 1428; 305-315
- [81] Angerosa, F.; Basti, C.; Vito, R.; “Virgin Olive Oil Volatile Compounds from Lipoxygenase Pathway and Characterization of Some Italian Cultivars”; *J. Agric. Food Chem.*; 1999; 47; 836-839
- [82] Aldrich; “Flavours & Fragrances – Featuring Naturals and Essential Oils”; International Edition; 1998-1999
- [83] The Good Scents Company - <http://www.thegoodscentscompany.com> acedido em Agosto de 2017
- [84] Aparicio, R.; Morales, M.; “Characterization of Olive Oil Ripeness by Green Aroma Compounds of Virgin Oil”; *J. Agric. Food Chem.*; 1998; 46; 1126-1122
- [85] Koprivnjak, O.; Procida, G.; Zelinotti, T.; “Changes in the Volatile Components of Virgin Olive Oil during Fruit Storage in Aqueous Media”; *Food Chemistry*; 2000; 70; 377-384

- [86] Olías, J.; Pérez, A.; Ríos, J.; Sanz, L.; “Aroma of Virgin Olive Oil: Biogenesis of the “Green” Odor Notes”; *J. Agric. Food Chem.*; 1993; 41; 2368-2373
- [87] Solinas, M.; Angerosa, F.; Marsilio, V.; “Indagine su alcuni componenti dell’aroma degli oli vergini di oliva in relazione alla varietà delle olive”; *Riv. Ital. Sost. Grasse*; 1988; 77; 359-367
- [88] Morales, M.; Ríos, J.; Aparicio, R.; “Changes in the Volatile Composition of Virgin Olive Oil during Oxidation: Flavours and Off-Flavours”; *J. Agric. Food Chem.*; 1997; 45; 2666-2673
- [89] Vichi, S.; Pizzale, L.; Conte, L.; Buxaderas, S.; López-Tamames, E.; “Solid-Phase Microextraction in the Analysis of Virgin Olive Oil Volatile Fraction: Modifications Induced by Oxidation and Suitable Markers of Oxidative Status”; *J. Agric. Food Chem.*; 2003; 51; 6564-6571
- [90] Ranalli, A.; Ferrante, M.; Mattia, G.; Constantini, N.; “Analytical Evaluation of Virgin Olive Oil of First and Second Extraction”; *J. Agric. Food Chem.*; 2004; 84; 533-537
- [91] Morales, M.; Alonso, V.; Ríos, J.; Aparicio, R.; “Virgin olive oil aroma: relationship between volatile compounds and sensory attributes by chemometrics”; *J. Agric. Food Chem.*; 1995; 43; 2925-2931
- [92] Dhifi, W.; Maalaoui, B.; Zitoun, B.; Marzouk, B.; “Influence du système d’extraction sur la qualité organoleptique de l’huile d’olive de Tunisie”; *Riv. Ital. Sost. Grasse*; 2002; 79; 245-249
- [93] Keszler, A.; Kriska, T.; Németh, A.; “Mechanism of Volatile Compound Production during Storage of Sunflower Oil”; *J. Agric. Food Chem.*; 2000; 48; 5981-5985
- [94] Mateus, E.; Barata, R.C.; Zrostlíková J.; Gomes da Silva, M.D.R.; Paiva, M.R.; “Characterization of the volatile fraction emitted by *Pinus* spp. by one- and two-dimensional chromatographic techniques with mass spectrometric detection”; *J. Chromatogr. A.*; 2010; 1217; 1845-1855
- [95] Ribeiro, L.; Costa Freitas, A.; Gouveia, J.; Gomes da Silva, M.; “Study of Volatile Compounds in Olive Oil Samples to Characterize “Tulha” Attribute”; 25th International Symposium on Capillary Gas Chromatography; Riva del Garda, Itália; Maio 2004
- [96] Adams, R.P.; “Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry”; Allured Publishing Corporation; Carol Stream; IL.; 1995
- [97] Bianchi, F.; Careri, M.; Mangia, A.; Musci, M.; “Retention index in the Analysis of food aroma volatile compounds in temperature-programmed gas chromatography: Database creation and evaluation of precision and robustness”; *Journal of Separation Science*; 2007; 30; 563-572
- [98] Binder, R.G.; Turner, C.E.; Flath, R.A.; “Volatile components of purple starthistle”; *J. Agric. Food Chem.*; 1990; 38; 1053-1055;
- [99] Choi, H. S.; “Character impact odorants of citrus hallabong [(*C. unshiu* Marcov x *C. sinensis* Osbeck) x *C. reticulata* Blanco] cold-pressed peel oil” *J. Agric. Food Chem.*; 2003; 51; 2687-2692
- [100] Chung, T.Y.; Eiserich, J.P.; Shibamoto, T.; “Volatile compounds produced from peanut oil heated with different amounts of cysteine”; *J. Agric. Food Chem.*; 1994; 42; 1743-1746
- [101] Cullere, L.; Escudero, A.; Cacho, J.; Ferreira, V.; “Gas chromatography-olfactometry and chemical quantitative study of the aroma of six premium quality Spanish aged red wines” *J. Agric. Food Chem.*; 2004; 52; 1653-1660

- [102] Ferreira, V.; Aznar, M.; Lopez, R.; Cacho, J.; "Quantitative gas chromatography-olfactometry carried out at different dilutions of an extract. Key differences in the odor profiles of four high-quality Spanish aged red wines"; *J. Agric. Food Chem*; 2001; 49; 4818-4824
- [103] Gomes da Silva, M.D.R.; Freitas, A.M.C.; Cabrita, M.J.B.; Garcia, R.; "Olive Oil Composition: Volatile Compounds"; *Olive Oil*; 2012; 2; 17-46
- [104] Hognadottir, A.; Rouseff, R.L.; "Identification of aroma active compounds in orange essence oil using gas chromatography - olfactometry and gas chromatography - mass spectrometry." *J. Chromatogr. A.*; 2003; 998; 201-211
- [105] Khan, M.; Mahmood, A.; Alkhathlan, H. Z.; "Characterization of leaves and flowera volatile constituents of *Lantana camara* growing in central region of Saudi Arabia"; *Arabian Journal of Chemistry*; 2016; 9; 764-774
- [106] Lee, S.J.; Noble, A.C.; "Characterization of odor-active compounds in Californian Chardonnay wines using GC-olfactometry and GC-mass spectrometry"; *J. Agric. Food Chem.*; 2003; 51; 8036-8044
- [107] Le Guen, S.; Prost, C.; Demaimay, M.; "Characterization of odorant compounds of mussels (*Mytilus edulis*) according to their origin using gas chromatography - olfactometry and gas chromatography - mass spectrometry" *J. Chromatogr. A.*; 2000; 896; 361-371
- [108] Nishimura, O.; "Identification of the characteristic odorants in fresh Rhizomes of ginger (*Zingiber officinale* Roscoe) using aroma extract dilution analysis and modified multidimensional gas chromatography-mass spectroscopy"; *J. Agric. Food Chem*; 1995; 43; 2941-2945
- [109] Qian, M.; and Reineccius, G.; "Potent aroma compounds in Parmigiano Reggiano cheese studied using a dynamic headspace (purge-trap) method"; *Flavour Fragr. J.*; 2003; 18; 252-259
- [110] Rega, B.; Fournier, N.; Nicklaus, S.; Guichard, E.; "Role of pulp in flavor release and sensory perception in orange juice"; *J. Agric. Food Chem.*; 2004; 52; 4204-4212
- [111] Ruther, J.; "Retention index database for identification of general green leaf volatiles in plants by coupled capillary gas chromatography-mass spectrometry"; *J. Chromatogr. A.*; 2000; 890; 313-319
- [112] Umano, R.P.; Hagi, Y.; Shibamoto, T.; "Volatile chemicals identified in extracts from newly hybrid citrus, Dekopon (*Shiranuhi* mandarin *Suppl. J.*)"; *J. Agric. Food Chem.*; 2002; 50; 5355-5359
- [113] Valim, M.F.; Rouseff, R.L.; Lin, J.; "Gas chromatographic-olfactometric aharacterization of aroma compounds in two types of cashew apple néctar"; *J. Agric. Food Chem.*; 2003; 51; 1010-1015
- [114] Weckerle, B.; Bastl-Borrmann, R.; Richling, E.; Hör, K.; Ruff, C.; Schreier, P.; "Cactus pear (*Opuntia ficus indica*) flavour constituents - chiral evaluation (MDGC-MS) and isotope ratio (HRGC-IRMS) Analysis"; *Flavour Fragr. J.*; 2001; 16; 360-363